

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR2005/003923

International filing date: 18 November 2005 (18.11.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: PCT/KR2004/003034  
Filing date: 23 November 2004 (23.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 February 2006 (22.02.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : PCT/KR2004/003034  
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 11월 23일  
Date of Application NOV 23, 2004

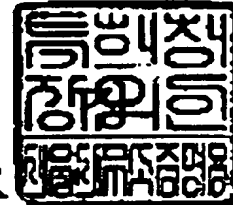
출원인 : Korea Research institute of  
Bioscience and Biotechnology  
Applicant(s)



2006년 01월 23일

특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage ([www.kipo.go.kr](http://www.kipo.go.kr)). But please notice that the

PCTA9411-8

1/5

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

6-1-2004-0019499-38



PCT/KR2004/003034

2004.11.23

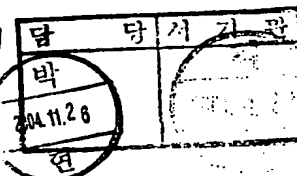
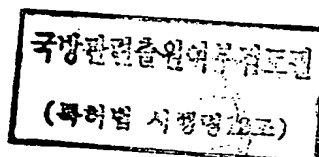
수리관청(우만웅)

PCT/KR 2004/0 03 034

23 NOVEMBER 2004 (23.11.2004.)

Korean Intellectual Property Office  
P C T International Application

0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Korean Intellectual Property Office (RO/KR)
0-7	Applicant's or agent's file reference	PCTA9411-8
I	Title of Invention	BETA-CASEIN GENE TARGETING VECTOR USING HOMOLOGOUS RECOMBINATION
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	Korea Research institute of Bioscience and Biotechnology
II-5	Address	52, Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon305-806 Republic of Korea
II-6	State of nationality	KR
II-7	State of residence	KR
II-8	Telephone No.	82-42-860-4429
II-9	Facsimile No.	82-42-860-4608
II-10	e-mail	ymhan@kribb.re.kr



PCTA9411-8

2/5

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	HAN, Yong-Mahn
III-1-5	Address	110-305, Hanul Apt, Sinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon305-707 Republic of Korea
III-1-6	State of nationality	KR
III-1-7	State of residence	KR
III-2	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	LEE, Kyung-Kwang
III-2-5	Address	106-1101, Shindong-a Apt, Yongjeon-dong, Dong-gu, Daejeon300-766 Republic of Korea
III-2-6	State of nationality	KR
III-2-7	State of residence	KR
III-3	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	CHANG, Mira
III-3-5	Address	109-8, Nagyang-dong, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do742-901 Republic of Korea
III-3-6	State of nationality	KR
III-3-7	State of residence	KR
III-4	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	KOO, Deog-Bon
III-4-5	Address	109-1503, Hanul Apt, Sinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon305-707 Republic of Korea
III-4-6	State of nationality	KR
III-4-7	State of residence	KR

PCTA9411-8

3/5

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent	
IV-1-1	Name (LAST, First)	SON, Min	
IV-1-2	Address	19th Floor, City Air Tower, 159-9 Samsung-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-973 Republic of Korea	
IV-1-3	Telephone No.	81-2-2016-7900	
IV-1-4	Facsimile No.	81-2-2016-7905	
IV-1-5	e-mail	minson@hanollawip.com	
V	DESIGNATIONS		
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.		
V-2	Item V-2 may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. As to the consequences of such national law provisions in these and certain other States, see Designations in PCT-SAFE Help.	KR	
VI-1	Priority Claim	NONE	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Korean Intellectual Property Office (ISA/KR)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

PCTA9411-8

4/5

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION )

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	31	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	14	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	54	-
IX-6a	Sequence listing part of description	2	-
IX-7	TOTAL	56	✓
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. PCTA9411-8	-
IX-16(A)	Sequence listing in computer readable form		
IX-16(A) -(ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	2	
IX-20	Language of filing of the international application	Korean	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	SON, Min	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		



PCTA9411-8

5/5

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	23 NOVEMBER 2004 (23.11.2004.)
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/KR
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCTA9411-8

1/1

**PCT REQUEST (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)**

Original (for SUBMISSION)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only		
0-1	International Application No.		
0-2	Date stamp of the receiving Office		
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet		
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)	
0-9	Applicant's or agent's file reference		PCTA9411-8
2	Applicant		KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (KRW)
12-1	Transmittal fee T	⇒	45000
12-2-1	Search fee S	⇒	225000
12-2-2	International search to be carried out by	KR	
12-3	International filing fee (first 30 sheets) i1	1329000	
12-4	Remaining sheets	26	
12-5	Additional amount (X)	14000	
12-6	Total additional amount i2	364000	
12-7	i1 + i2 = I	1693000	
12-12	EASY Filing reduction R	-95000	
12-13	Total International filing fee (i-R) I	⇒	1598000
12-14	Fee for priority document		
	Number of priority documents requested	0	
12-15	Fee per document (X)	0	
12-16	Total priority document fee: P	⇒	
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒	1868000
12-19	Mode of payment	cash	



PCTA9411-8

1/1

PCT

Original (for SUBMISSION )  
 (This sheet is not part of and does not count as a sheet of the International application)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	PCTA9411-8

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	24
1-2	line	26-28
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	KCTC Korean Collection for Type Cultures
1-3-2	Address of depositary institution	52, Oun-dong, Yusong-Ku, Taejon 305-333, Republic of Korea
1-3-3	Date of deposit	10 November 2004 (10.11.2004)
1-3-4	Accession Number	KCTC 10720BP
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designations

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the International Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

## General Power of Attorney

Agent:

Name: SON, Min  
Address: 19<sup>th</sup> Floor, City Air Tower,  
159-9 Samsung-dong, Kangnam-gu,  
Seoul, 135-973, Republic of Korea

I/We, the undersigned, do hereby appoint the above-identified agent as my/our agent to act for me/us in all proceedings concerning with any and all of the following International Application.

Date: November 19, 2004

Applicants:

Name: Korea Research institute of Bioscience and Biotechnology  
Address: Eoeun-dong 52,  
Yuseong-gu, Daejeon, 305-806, Republic of Korea



Name: HAN, Yong-Mahn  
Address: #110-305, Hanul Apt, Sinseong-dong,  
Yuseong-gu, Daejeon, 305-707, Republic of Korea



Name: LEE, Kyung-Kwang  
Address: #106-1101, Shindong-a Apt, Yongjeon-dong,  
Dong-gu, Daejeon, 300-766, Republic of Korea



Name: CHANG, Mira  
Address: Nagyang-dong 109-8  
Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, 742-901, Republic of Korea



Name: KOO, Deog-Bon  
Address: #109-1503, Hanul Apt, Sinseong-dong,  
Yuseong-gu, Daejeon, 305-707, Republic of Korea



상동 재조합을 이용하는 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터(Beta-casein gene targeting vector using homologous recombination)

## 기술분야

5

본 발명은 상동 재조합 방법으로 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터, 상기 벡터로 유전자 타겟팅된 동물 세포 및 상기 동물세포로 핵이식된 수정란에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 수정란을 착상시켜 제조된 형질전환된 동물의 우유로부터 목적 단백질을 수득하는 방법에 관한 것이다.

10

## 배경기술

유전자의 존재 및 역할을 규명하기 위한 동물 유전학의 꾸준한 진보는 형질전환 동물의 생산을 가능케 했다, 형질전환 동물은 약품, 농업 등의 산업 전반에서 큰 경제적인 이익을 가져다 줄 수 있다. 이런 형질전환 또는 유전자 조작된 동물의 제조를 위한 미세주입법 (microinjection), 바이러스 감염 (viral transfection), 스펜 벡터 (sperm vector), 배아줄기세포 (ES)의 이용, 체세포 핵이식법 (SNCT) 등의 다양한 기술이 개발되어 왔다.

미세주입법은 DNA를 수정란의 전핵에 삽입하는 방법으로 (Harbers et al., Nature., 293(5833): 540-2, 1981; Brinster et al., Cell., 27:223-231, 1981; Gordon et al., Proc Natl Acad Sci USA., 77(12):7380-7384; Costantini et al., Nature., 294(5836):92-94), 현재까지 형질전환 동물을 생산하기 위해 널리 이용되어지고 왔다 (Hammer et al., Nature., 315(6021):680-683, 1985; van Berkel et al., Nat Biotechnol., 20(5):484-487, 2002; Damak et al., Biotechnology(NY), 14(2):185-186, 1996). 그러나 미세주입법으로 DNA가 삽입된 수정란으로부터 형질전환된 산자의 생산 비율은 2 내지 3 % 로 효율이 매우 낮다 (Clark et al., Transgenic Res., 9:263-275, 2000). 그러므로 미세주입법에 의한 형질전환 동물 생산은 노동 집약적이고 많은 동물과 정교한 부대시설을 요구하므로 많은 비용이 든다 (Brink et al., Theriogenology, 53:139-148, 2000). 미세주입법의 또 다른 단점은 발현시키고자 하는 외래 유전자의 삽입 위치와 수를 결정할 수 없다는 점이다. 그러므로, 무작위적인 삽입으로 형질전환된 동물에서의

외래 단백질 발현은 조절되지 않으므로 불규칙적으로 발현되고 양도 소량이다. 더구나 외래 유전자의 무작위적인 발현은 배 발달에 치명적인 문제를 일으키는 것으로 보고되었다 (Wei et al., Annu Rev Pharmacol Toxicol., 37:119-141, 1997).

레트로바이러스 매개 방법 또한 동물의 유전자 조작을 위해 널리 사용된다(Soriano et al., Genes Dev., 1(4):366-375, 1987; Hirata et al., Cloning Stem Cells., 6(1):31-36, 2004). 레트로바이러스 매개 방법에서, 삽입하고자 하는 유전자는 바이러스 벡터를 통하여 동물의 유전자로 도입된다. 이 방법은 미세주입법보다 좀더 효율적이기는 하지만, 여전히 외래 유전자의 무작위적인 삽입과 모자이크(mosaicism)이 문제시 된다 (Piedrahita et al., Theriogenology, 53(1):105-116, 2000). 게다가 삽입하고자 하는 유전자 최대 사이즈는 7 kb로 제한되며, 바이러스에 의해 발현되는 단백질이 문제가 될 수도 있다 (Wei et al., Annu Rev Pharmacol Toxicol., 37:119-141, 1997; Yanez et al., Gene Ther., 5(2):149-159, 1998).

위에서 언급한 그러한 문제점들 극복하여, 특정 유전자를 제거 또는 삽입할 수 있는 유전자 타겟팅 기술이 개발되었다. 유전자 타겟팅 기술은 마우스 배아 줄기세포를 이용한 유전자 기능 연구에서 처음으로 사용되었다. 마우스 배아 줄기세포는 배아로 미리 정해진 유전자 조작을 하는데 사용된다. 마우스 배아줄기세포에 유전자 타겟팅법을 이용하면서, 많은 수의 특정 유전자 타겟팅된 마우스가 생산되었다 (Brandon et al., Curr Biol., 5(6):625-634, 1995; Capecchi et al., Science, 244(4910):1288-1292, 1989; Thompson et al., Cell, 56(2):313-321, 1989; Hamanaka et al., Hum Mol Genet., 9(3):353-361, 2000; Thomas et al., Cell, 51(3):503-512, 1987; te Riele et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89(11):5182-5187, 1992; Mansour et al., Nature, 336(6197), 348-352, 1988; Luo et al., Oncogene, 20(3):320-328, 2001). 이 유전자 타겟팅법이 가축에 적용될 때, 대량의 치료 단백질을 생산하는 동물생체 반응기 (animal bioreactor), 질병 모델 동물 생산이 가능하며, 이것은 산업적으로 큰 경제적인 이익을 가져올 것이다.

현재까지 재조합 치료 단백질은 효소, 박테리아, 동물 세포와 같은 세포배양 시스템을 통해서 생산되어져 왔다. 그러나 세포 배양 시스템은 특성상 대량 생산이 불가능하므로 굉장히 고가이며, 몇몇 단백질은 글라코실레이션 (glycosylation),  $\gamma$ -카보실레이션 ( $\gamma$ -carboxylation), 하이드록실레이션 (hydroxylation)과 같은

posttranslation이 제대로 이루어지지 않기 때문에 부가적인 실험이 요구된다 (Houdebine et al., Transgenic Res., 9(4-5):305-320, 2000; Lubo et al., Transgenic Res., 9(4-5):301-304, 2000).

그러나, 형질전환 동물로부터 치료 단백질 등을 생산하는 동물생체 반응기  
5 시스템은 매우 경제적이고 효율적인 발현시스템으로 여겨진다. 특히, 형질전환 소로부터  
재조합 치료 단백질의 대량 생산은 세포 배양 시스템과 비교할 때 매우 효율적이다 (van  
Berkel et al., Nat Biotechnol., 20(5):484-487, 2002). 그 중에서도 동물의 우유로부터  
생산되는 재조합 단백질은 인체 단백질과 거의 유사하게 번역후 수식 (posttranslational  
modification) 되는 것으로 알려진다 (Edmunds et al., Blood, 91(12):4561-4571, 1998;  
10 Velandar et al., Proc Natl Acad Sci USA., 89(24):12003-12007, 1992; van Berkel et al.,  
Nat Biotechnol., 20(5):484-487, 2002).

소의 우유는 약 88%의 수분, 3.3%의 단백질, 그 외 탄수화물과 지질로 이루어져  
있다. 카제인은 우유 단백질의 80%를 차지하는데, 알파 S1, 알파 S2, 베타, 카파  
카제인이 있으며, 그 중에서 베타-카제인은 소 우유에서 10mg/ml 농도로 발현되는 가장  
15 풍부한 우유 단백질이다 (Brophy et al., Nat Biotechnology., 21(2):157-162, 2003).

체세포 핵이식법 (SCNT)을 이용하여 형질전환 동물을 제조하는 것이  
미세주입법보다 더 효율적인데, 이는 형질전환된 체세포로부터 유래한 복제 동물의 거의  
대부분이 형질전환 동물이기 때문이다 (Brink et al., Theriogenology, 53:139-148, 2000).  
20 또한, 체세포 핵이식법을 이용할 경우 생산하고자 하는 동물의 성을 결정할 수 있고  
유전적으로 동일한 동물의 생산이 가능하다는 장점이 있다 (Lubo et al., Transgenic Res.,  
9(4-5):301-304, 2000; van Berkel et al., Nat Biotechnol., 20(5):484-487, 2002).  
최근까지 유전자 타겟팅된 동물을 생산하기 위해서, 배아줄기세포와 유전자 타겟팅  
벡터가 필수적인 요소로 여겨져 왔다. 돼지와 소에서 배아줄기세포와 거의 유사한  
25 세포주들이 보고되었음에도 불구하고, 가축에서 배아 줄기 세포의 사용은 제한된다  
(Doetschman et al., Dev Biol., 127(1):224-227, 1988; Stice et al., Biol Reprod.,  
54(1):100-110, 1996; Sukoyan et al., Mol Reprod Dev., 36(2):148-158, 1993;  
Iannaccone et al., Dev Biol., 163(1):288-292, 1994; Pain et al., Development,  
122(8):2339-2348, 1996; Thomson et al., Proc Natl Acad Sci USA., 92(17):7844-7848,  
30 1995; Wheeler et al., Reprod Fertil Dev., 6(5):563-568, 1994). 대신에, 핵 공여

세포로서 일반 체세포가 유전자 타겟팅에 사용될 수 있다는 가능성이 제시되면서, 형질전환 소 생산을 위한 실질적이고 효율적인 방법으로 제안되었다 (Brophy et al., Nat Biotechnol., 21(2):157-162, 2003; Cibelli et al., Science, 280(5367):1256-1258, 1998; Campbell et al., Nature, 380(6569):64-66, 1996; Wilmut et al., Experientia, 47(9):905-912, 1997; Denning et al., Cloning stem cells, 3(4):221-231, 2001).

체세포 핵이식법을 이용하면서, 우유 단백질 유전자의 프로모터 부분은 형질전환 대 동물의 우유에서 재조합 단백질의 발현을 유도하기 위해서 사용되어져 왔다 (Schnieke et al. Science, 278(5346):2130-2133, 1997; Baguisi et al., Nat Biotechnol., 17(5):456-461, 1999; Brophy et al., Nat Biotechnol., 21(2):157-162, 2003). 그러나 외래 유전자의 무작위 삽입에 의해 야기되는 재조합 단백질의 소량 발현, 정규 장소 외의 발현과 같은 문제점들이 해결되지 않는 한, 체세포 핵이식법에 의한 형질전환 가축의 생산은 여전히 현실성이 없다. 외래 유전자의 정규 장소 외의 발현은 배 발달에 치명적인 장애를 일으키고 배아 발달 후기와 출생 후 초기에 대부분 발달하는 신경 시스템에 굉장히 치명적이다 (Gao et al., Neurochem Res., 24(9):1181-1188, 1999). 이러한 부작용들을 제거하기 위해서, 외래 유전자를 수유기 동안 유선조직에서만 특이적으로 발현 시키는 새로운 방법이 개발되었다 (Houdebine et al., Transgenic Res., 9(4-5):305-320, 2000). 상동 재조합(homologous recombination)에 의해 게놈 유전자의 특정 위치를 조작하는 것으로 알려진 유전자 타겟팅 방법은 재조합 단백질의 조직 특이적인 발현을 위한 최적의 수단이다 (Muller et al., Mech Dev., 82(1-2):3-21, 1999; Clark et al., J Mammary Gland Biol Neoplasia., 3(3):337-350, 1998).

외래 유전자가 타겟팅된 복제양의 첫 생산은 치료 단백질 유전자가 타겟팅된 대 동물 생산의 가능성을 열었다 (McCreath et al., Nature, 405(6790):1066-1069, 2000). 섬유아세포에서 많이 발현되는 COL1A1 유전자 타겟팅을 위한 COLT-2 타겟팅 벡터가 제작되었고, 이 벡터는 유전자 타겟팅을 유도하기 위해 promoter-trap enrichment를 이용하였다. 그리고 외래유전자 AATC2는 양 베타 락토글로블린 발현 벡터 안에 인체  $\alpha 1$ -안티트립신 (AAT: antitrypsin)를 가지고 있고 독립적인 전사단위를 가지면서 유선에서 발현을 유도하기 위해 제작되었다. 유전자 타겟팅된 양에서 분비되는 AAT의 양은 무작위적으로 외래 유전자가 삽입된 양에 비해서 약 37배 더 많았다 (McCreath et al., Nature, 405(6790):1066-1069, 2000). 따라서 유전자 타겟팅 방법은 치료단백질의 대량생산을 위해서 최상의 수단으로 여겨지고 있다. 그러나 프로모터-트랩 (promoter-

trap)을 이용한 유전자 타겟팅 벡터 사용은 유전자가 도입되는 체세포에서 활발히 전사되는 유전자로 제한된다. 일반적으로, 활발하게 전사되는 유전자는 전혀 전사가 일어나지 않는 유전자에 비해서, 상동 재조합이 더 자주 일어나는 것으로 알려졌다 (Kuroiwa et al., Nat Genet., 36(7):775-780, 2004).

5 유선 조직은 우유 단백질이 조직 특이적으로 과량 발현되는 조직이다. 그러므로 이런 우유 단백질을 코딩하는 유전자의 조작을 통해서 배 발달 또는 출생 후 발달에 장애 없이 외래 단백질을 대량 발현시킬 수 있다. 그 중에서, 가장 높은 농도로 발현되는 베타-카제인이 바람직하다. 소의 베타-카제인 유전자는 전체 게놈의 DNA 상에 한 개로 존재하고, 유선 조직외 일반 체세포에서는 전혀 발현이 되지 않는 유전자이다.

10 체세포에서 발현이 전혀 이루어지지 않는 게놈 베타-카제인 유전자로 외래의 목적 단백질을 타겟팅하기 위해서는 프로모터-트랩을 이용하는 유전자 타겟팅 벡터가 이용될 수 없다.

이에 본 발명자는 베타-카제인 유전자 특이적인 타겟팅 벡터 카세트를 제조하고,

15 상기 벡터 카세트로 베타-카제인 유전자로 목적 단백질을 코딩하는 외래 유전자가 삽입된 벡터를 완성하고, 그 벡터가 도입된 동물 세포와 상기 세포로 핵이식된 수정란을 제조한 뒤, 이 경우, 목적 단백질이 게놈의 베타-카제인 유전자로 정확하게 타겟팅 되었음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

## 20 발명의 요약

본 발명의 하나의 목적은 (1) 베타-카제인 유전자의 프로모터를 갖고 이 프로모터의 전후에 위치한 베타-카제인 유전자의 핵산 서열에 상동인, 5 내지 12kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제1 영역, (2) 목적 단백질 코딩하는 핵산 클로닝 부위, (3)

25 포지티브 선별마커 영역, 및 (4) 베타-카제인 유전자 핵산 서열에 상동인 2 내지 4kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제2 영역을 포함하고, 제1 영역이 베타-카제인 유전자의 핵산 서열의 5'-3' 배열에 있어 상부(upstream)에 해당하고 제2 영역이 하부(downstream)에 해당함을 특징으로 하는 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 유전자 타겟팅된 동물세포를 제공하는

30 것이다.



본 발명의 또 다른 목적은 상기 동물세포로 핵이식된 수정란을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 동물 세포내로 도입하는 단계; 목적 유전자가 상동 재조합에 의하여 유전자 타겟팅된 세포를 선별하는 단계; 동물 난자의 핵을 제거하고 유전자 타겟팅된 세포를 도입하는 단계를 포함하는 체세포 핵이식된 수정란을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 동물 세포내로 도입하는 단계; 목적 유전자가 상동 재조합에 의하여 유전자 타겟팅된 세포를 선별하는 단계; 동물 난자의 핵을 제거하고 유전자 타겟팅된 세포를 도입하여 체세포 핵이식된 수정란을 제조하는 단계; 및 상기 수정란을 착상시켜 제조된 형질전환 동물로부터 우유를 생산하는 단계를 포함하여 목적 단백질을 우유로부터 수득하는 방법에 관한 것이다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1은 소 베타-카제인 유전자 타겟팅을 위해 제작된 pBluescript II SK(+) 플라스미드 내에 있는 18.8 kb pBCKI I 벡터 카세트를 보여준다. 벡터 카세트는 *neo* 유전자 앞에 Sac II, Not I, BamH I 제한효소 위치를 포함하고 있으며, 숏트 암(short arm) 부위 뒤에 BamH I 제한효소 위치를 가지고 있다

도 2는 소 베타-카제인 유전자 타겟팅을 위해 제작된 pGEM7Zf(+) 플라스미드 내에 있는 14.8 kb pBCKI II 벡터 카세트를 보여준다.

도 3은 pBCKI I 벡터 카세트와 타겟팅된 베타-카제인 유전자 간의 상동 재조합 현상을 보여준다. 소 베타-카제인 유전자 위치에서의 이중교차에 의한 결과로서, 내생적(endogenous) 베타-카제인 염기 서열이 벡터 카세트의 염기 서열로 교체됨을 보여준다.

도 4는 pBCKI II 벡터 카세트와 타겟팅된 베타-카제인 유전자 간의 상동 재조합 현상을 보여준다. 소 베타-카제인 유전자 위치에서의 이중교차에 의한 결과로서, 내생적 베타-카제인 염기 서열이 벡터 카세트의 염기 서열로 교체됨을 보여준다.

도 5는 소 베타-카제인 위치에서 일어나는 유전자 타겟팅을 확인하기 위하여 사용된 PCR 분석 전략과 타겟팅된 베타-카제인 위치의 접합점 부위와 벡터 카세트 내의 제한효소 위치의 염기 서열을 보여준다. 상위 그림은 *neo* 유전자로부터 벡터 카세트 내에 존재하지 않는 내생적 베타-카제인 위치까지의 4 kb DNA 단편을 합성하기 위한 프라이머 세트의 적절한 위치를 보여준다. 염기 서열 A는 롱 암(long arm)과 *neo* 유전자

접합점 부위의 염기 서열이다. 염기 서열 B는 숏트 암 과 *neo* 유전자 접합점 부분의 염기 서열로, 5' PCR 프라이머가 위치한다. 염기 서열 C는 숏트 암 과 벡터 카세트에는 존재하지 않는 내생적 베타-카제인 유전자 접합점 부위의 염기 서열을 보여주고, 3' PCR 프라이머가 위치한다.

5           도 6은 앞서 보고된 pBC10 벡터를 보여준다 (Kim et al., J Biochem (Tokyo), 126(2):320-5, 1999). pBC10 벡터는 pBluescript IISK 벡터 안에 있는 소 베타-카제인 프로모터 부위 10 kb 포함하고 있다. 소 베타-카제인 유전자 프로모터 부위는 유전자 5'-flanking 서열의 8 kb와 해독되지 않는 엑손 1 및 2 (vertical open boxes), 2 kb 인트론 1을 포함하고 있다. 프로모터는 Sac I, AatII, SacII 제한효소 위치를 가지고 있지만, 10       Sma I, BamH I, Sal I, Spe I, Cla I 같은 제한효소 위치는 없다.

          도 7은 pBC10 벡터를 Sac I 과 SacII 제한효소로 자른 결과 분리된 10 kb DNA 단편을 보여주고 있다. 분리된 10 kb DNA 단편은 pBCKI I 벡터 카세트의 룡암 (제1 영역에 해당)으로 사용하였다.

          도 8은 pBC10 벡터를 AatII과 SacII 제한효소로 자른 결과 분리된 6 kb 15       DNA를 보여주고 있다. 분리된 6 kb DNA은 pBCKII 벡터 카세트의 카세트의 룡암 (제1 영역에 해당)으로 사용하였다.

          도 9는 pBCKI I 와 pBCKII 벡터 카세트의 제2 영역(short arm)으로 사용된 pBC3.1 벡터의 제작순서를 보여준다. 소 베타-카제인 유전자의 엑손 5, 6, 7 ,8을 포함하고 있는 3.2 kb DNA 단편을 Xho I 와 Sal I (굵은체) 제한효소 위치를 가지고 있는 20       프라이머 세트를 이용하면서 소 염색체 DNA (chromosomal DNA)으로부터 PCR 합성하였다. 합성된 DNA 단편을 Xho I 와 Sal I 제한효소를 이용하여 자른 후, pGEM-T vector (Promega)의 Sal I 인식 부위로 연결하였다. pGEM-T 벡터 내에 있는 3.2 kb DNA 단편을 HincII 와 Sal I 제한효소로 다시 자른 후, pBluescript IISK(+)의 Sal I 인식부위로 연결하였다.

25           도 10은 pMAM*neo* 벡터 (CLONTECH)에서 SV40 *ori*, 초기 프로모터 (early promoter), 네오마이신 저항성 유전자와 SV40 초기 스프라이싱 (early splicing) 부위, polyadenylation 부위를 포함하고 있는 *neo* 유전자를 선별하는 과정을 보여준다. BamH I 제한효소로 잘린 2.7 kb *neo* 유전자 단편을 pBluescript IISK(+)의 BamH I 30       제한효소 위치로 연결하였다. pBluescript IISK(+)내에 있는 *neo* 유전자의 2 kb DNA 단편을 BglII 와 BamH I 제한효소로 자른 후, pSP73 vector (Promega)의 BglII

제한효소 위치로 연결하였다. BglII 와 EcoRV 제한효소로 잘린 pSP73 벡터의 2 kb 단편을 pneo2.7 벡터 구조물을 만들기 위해 0.7 kb *neo* 유전자를 포함하고 있는 pBluescript II SK(+) 벡터의 BglII 와 EcoRV 제한효소 위치로 재 연결하였다.

도 11은 pBCKI I 와 pBCKI II 벡터 카세트의 제작 과정을 보여준다. pBluescript II SK(+) 벡터 안에 있는 양성 선별마커와 숏트 암 DNA 단편을 적절한 제한효소를 사용하여 자른 후, BamHI, EcoRV, Sal I 제한효소 위치를 사용하면서, pBC10 DNA 단편을 포함하고 있는 pBluescript II SK(+) 벡터 내로 연결하였다. 결과적으로 pBCKI I 벡터 카세트는 10 kb 롱 암, 선별마커 유전자, 숏트 암을 포함하고 있다. pBCKI I 벡터의 롱 암 길이를 짧게 하기 위하여, AatII 와 Sal I 제한효소로 자른 DNA 단편을 pGEM7Zf(+) vector의 AatII 와 Xho I 제한효소 위치로 연결하였다. 그 결과, 6 kb 롱 암 과 *neo* 유전자, 숏트 암을 가지고 있는 pBCKI II 벡터 카세트를 완성했다.

도 12는 pBCKI I 벡터 카세트 내에 유용한 유전자의 삽입을 보여준다. 치료용 단백질 유전자의 한 예로서, 인체 트롬보포이에틴 유전자 (hTPO)를 발명한 pBCKI I 벡터 카세트로 삽입하였다. 우리의 이전 연구에서, 인체 트롬보포이에틴 cDNA 전체 1 kb 를 PCR로 증폭했고, 소 성장 호르몬 (bGH) 유전자의 300 bp poly(A) 부가적 서열 (additional sequence)를 증폭된 cDNA 단편 하부에 있는 Kpn I 제한효소 위치에 연결시켰다 (Sohn, DNA Cell Biol., 18(11):845-852, 1999). hTPO cDNA 와 bGH 유전자를 포함하고 있는 1.3 kb DNA 단편은 pBCKI I 벡터 카세트의 SacII 와 Not I 제한효소위치로 삽입되었고, 그 결과 20.1 kb pBCTPOKI I 벡터 구조물이 완성되었다.

도 13은 pBCKI II 벡터 카세트 내에 hTPO cDNA 도입을 보여준다. 결과적으로, 16.1 kb pBCTPOKI II 벡터 구조물을 만들었으며, 그 순서는 도 12에 설명된 바와 동일하다.

도 14는 pBCTPOKI I 벡터를 제한효소 Sal I 으로 자른 후, 세포 내 도입을 위하여 사용된 선형화된 BCTPOKI I 벡터 구조를 보여준다.

도 15는 pBCTPOKI II 벡터를 제한효소 AatII 로 자른 후, 세포 내 도입을 위하여 사용된 선형화된 BCTPOKI II 벡터 구조를 보여준다.

도 16은 소 배아 섬유아세포 (bEF) 와 소 귀조직 섬유아세포 (bESF)의 형태를 보여준다. A 와 B는 꼭 찰 때 까지 자란, DNA가 도입되지 않은 (정상) bEF와 bESF이다. C 와 D는 발명된 벡터가 도입된 후 콜로니 형성을 보이는 bEF 와 bESF 이다. 항생제

저항성 *neo* 유전자를 포함하고 유전자 타겟팅 벡터를 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) 방법을 이용하여 bEF 와 bESF로 도입한 후, G418 (Gibco, Invitrogen corporation)을 처리하여 살아남은 세포주는, 외래 유전자의 도입 여부를 분석하였다.

도 17은 pBCKII 트랜스팩션 이후 살아 남은 세포주들의 PCR 분석을 보여준다. 화살표로 표시된 500 bp PCR DNA 단편에 대한 양성 시그널은 “+”으로 나타났으며, 음성 시그널은 “-”으로 나타냈다. 발명된 pBCTPOKII 벡터는 양성 대조구로써 사용하였으며, PCR은 hTPO 유전자에 대한 프라이머를 이용하였다.

도 18과 도 19은 long-range PCR 분석을 위하여 대조구로 사용된 *pneoBC3.7* 벡터의 제작 순서를 보여준다. 소 베타-카제인 유전자의 염기 7888 부터 8479에 상응하는 인트론 8과 엑손 9를 포함하고 있는 591bp DNA 단편은 프라이머 세트를 사용하면서 소 염색체 DNA로부터 PCR 증폭을 통해 준비하였다. 3' 프라이머는 굵은 글씨체로 표기된 것처럼 *Xho I* 제한효소 위치를 갖고 있다. 증폭된 PCR DNA 단편은 pGEM-T 벡터 내로 삽입되었고, 그 결과 pBC591 벡터 구조물을 완성했다. BC591 벡터를 *Sal I* 와 *Xho I* 제한효소를 이용하여 자른 후, 그 DNA 단편을 BC3.1 벡터의 *Sal I* 제한효소 위치 내로 연결하였다. 동시에, *pneoBC2.7* 벡터를 *BamHI* 와 *EcoRV* 제한효소로 자른 후, *BamHI* 과 *EcoRV* 제한효소로 잘린 BC3.1 벡터로 연결하였다. 그 결과, *pneoBC3.7* 벡터가 완성되었다. 화살표는 4 kb long-range PCR 합성을 위한 프라이머 세트를 보여준다.

도 20은 pBCTPOKII 벡터가 도입된 세포주의 long-range PCR 분석 결과를 보여준다. 화살표로 표시되는 4 kb 양성 시그널은 세포주 81 과 89번이 베타-카제인 유전자가 타겟팅되었음을 보여준다. 그 외의 다른 세포주들은 음성 시그널 (-)을 나타냈다. *pneoBC3.7* 벡터를 양성 대조구로 사용하였다.

도 21 타겟팅된 염기 서열을 재확인하기 위하여 써던 블랏 분석을 위한 전략을 보여준다. 외래 유전자가 도입된 세포주로부터 정제된 게놈 DNA(genomic DNA)와 pBCTPOKII 벡터를 *EcoRI* 제한효소로 잘랐다. *EcoRI* 의해 잘린 BCTPOKII 벡터의 DNA (A) 와 게놈 DNA (B) 단편 크기는 각각 9.2 kb 와 9.9 kb이다. hTPO 유전자 아래에 있는 막대는 써던 블랏 분석을 위해 사용된 프로브의 위치를 나타낸다. 프로브로 사용될 hTPO cDNA의 500 bp 단편을 PCR로 증폭하였다.

도 22은 써던 블랏 분석으로 유전자 타겟팅된 것으로 확인된 세포주를 보여준다. 81번 89번의 2개 세포주는 발명한 벡터가 내생적 소 베타-카제인 유전자 위치로

타겟팅되었음이 재확인되었다. 타겟팅된 세포주들은 9.9 kb 단편을 보여주며, 97, 47, 43, 34번 세포주들은 어떤 시그널도 나타내지 않았다. 다양한 농도에 있는 소 게놈 DNA를 음성 대조구로 사용하였으며, 또한 다양한 농도에 있는 BCTPOKII 벡터로부터 유래된 9.2kb 단편은 양성 대조구로 사용하였다.

5           도 23은 81번 세포주의 세포로부터 핵이식된 수정란의 nested PCR분석을 보여준다. 356bp의 양성 시그널 체세포로부터 복제된 수정란이 발명된 타겟팅 벡터를 가지고 있음을 보여준다. pBCTPOKII 벡터를 양성 시그널로 사용하였으며, nested PCR은 양성 시그널을 재확인하기 위하여 수행하였다.

10           도 24는 89번 클론의 세포로부터 핵이식된 수정란을 임신 준비된 어미소로 이식한 후, 임신 36일째인 어미소로부터 꺼낸 태막에 쌓여 있는 태아 (A), 태막을 제거한 태아 (B), 태막 세포 (C), 태막 세포의 long-range PCR 분석 (D) 을 보여준다. 4 kb 양성 시그널은 태아 유래의 태막 세포가 베타-카제인 유전자 타겟팅되었음을 보여준다. pneoBC3.7 벡터를 양성 대조구로 사용하였다.

## 15           발명의 상세한 설명

          하나의 양태로서, 본 발명은 (1) 베타-카제인 유전자의 프로모터를 갖고 이 프로모터의 전후에 위치한 베타-카제인 유전자의 핵산 서열에 상동인, 5 내지 12kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제1 영역, (2) 목적 단백질을 코딩하는 핵산 클로닝 부위, (3) 20           포지티브 선별마커 영역, 및 (4) 베타-카제인 유전자 핵산 서열에 상동인 2 내지 4kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제2 영역을 포함하고, 제1 영역이 베타-카제인 유전자의 핵산 서열의 5'-3' 배열 (5' to 3' orientation)에 있어 상부(upstream)에 해당하고 제2 영역이 하부(downstream)에 해당함을 특징으로 하는 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터에 관한 것이다.

25           본 발명에서 “유전자 타겟팅 벡터 (gene targeting vector)”는 게놈의 특정 유전자 위치로 목적하는 유전자를 제거 또는 삽입할 수 있는 벡터로, 상동 재조합 (homologous recombination)이 일어나도록 타겟팅하고자 하는 특정 유전자에 상동 염기 서열을 포함한다. 본 발명의 유전자 타겟팅 벡터는, 목적 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 게놈상의 베타-카제인 유전자에 5'-3'의 배열로 삽입되는 베타-카제인 타겟팅 30           벡터이다. “벡터”와 “벡터 카세트”는 동일한 의미로 사용되고 있으며, 원형(circular)

또는 선형(linear) 형태일 수 있다.

본 발명의 “베타-카제인 타겟팅 벡터”는 목적 단백질을 코딩하는 핵산 클로닝 부위 좌우로 베타-카제인 유전자의 핵산 서열에 상동인 서열을 가지는 제1 영역과 제2 영역을 포함한다. 제1 영역은 통 암에 해당하고, 제2 영역은 숏트 암에 해당한다.

5           본 발명의 “제1 영역”은 베타-카제인 유전자의 프로모터를 갖고 이 프로모터의 전후에 위치한 베타-카제인 유전자의 핵산 서열에 상동인, 5 내지 12kb 길이의 핵산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 소 베타-카제인 유전자 프로모터는 외래 단백질을 발현을 효과적으로 발현시키는 것으로 알려져 있고(Kim et al., J Biochem(Tokyo), 126(2):320-325, 1999), 이는 외래의 목적 단백질을 대량으로 생산하고자 하는 본 발명의 목적에  
10           적합하다. 제1 영역의 길이는 유전자 타겟팅 효율을 결정하는 중요한 요소로, 바람직하게는 5.5kb 내지 10kb의 길이, 가장 바람직하게는 6kb의 길이를 가진다.

          본 발명의 “제2 영역”은 베타-카제인 유전자 핵산 서열에 상동인 2 내지 4kb 길이의 핵산서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 2.5kb 내지 3.5kb의 길이를 가진다. 이 때, 제1 영역이 베타-카제인 유전자의 핵산 서열의 5'-3' 배열에 있어  
15           상부(upstream)에 해당하고 제2 영역이 하부(downstream)에 해당한다.

          상기 벡터로 타겟팅되는 베타-카제인 유전자는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 소, 양, 염소, 돼지, 말, 토끼, 개, 원숭이 등의 베타-카제인 유전자고, 보다 바람직하게는 소의 베타-카제인 유전자다

          본 발명에서 “상동 (homologous)”이란 제1 영역 또는 제2 영역과 이에 해당하는  
20           베타-카제인 유전자의 핵산 서열과의 동일성 정도를 나타내는 것으로, 적어도 90% 이상 동일하고, 바람직하게는 95% 이상 동일하다.

          본 발명의 “목적 단백질을 코딩하는 핵산 클로닝 부위”란 특정 제한효소로 인지되어 절단되는 부위로, 절단된 부위에 목적 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 간편하게 삽입될 수 있다.

25           상기 벡터의 클로닝 부위로 삽입 가능한 의학, 산업적으로 유용한 목적 단백질의 예에는 호르몬, 사이토카인, 효소, 응고인자, 수송 단백질, 수용체, 조절 단백질, 구조 단백질, 전사 인자, 항원, 항체 등이 있다.

          목적 단백질의 구체적인 예로는, 트롬보포이에틴, 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 콜로니  
30           자극인자류, 글루카곤-유사 펩타이드류 (GLP-1등), 지프로테인 관련수용체 (G-protein-

coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 효소류, 인터루킨 결합 단백질류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 피사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 피사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민,  $\alpha$ -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오펙테이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브리-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오택틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펙틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 체장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토펙린, 미오스타틴, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편 등이 있으며, 이로 제한되지 않는다.

본 발명에서 “선별마커 (selection marker)”란 세포로 유전자 타겟팅 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있고, 포지티브 선별마커와 네가티브 선별마커가 있다.

본 발명의 벡터는 포지티브 선별마커를 포함한다. “포지티브 선별마커”란 선택제 (selective agent)가 처리된 환경에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존하도록 하여 포지티브 선택을 가능하게 하는 마커로, 네오마이신 (Neomycin: Neo), 하이그로마이신 (hygromycin: Hyg), 히스티딘올 디하이드로게나제(histidinol dehydrogenase gene: hisD) 또는 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (guanine phosphosribosyltransferase: Gpt) 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

이 때, 포지티브 선별마커는 별개의 프로모터, polyA 등을 가지는 것을 특징으로 한다. 프로모터의 예에는, 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV 의 긴 말단

반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터 뿐만 아니라,  $\beta$ -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나, 이것으로 제한되지는 않는다.

5           또한, 본 발명의 벡터는 네가티브 선별마커를 추가로 포함할 수 있다. “네가티브 선별마커”는 무작위적 삽입 (random insertion)이 일어난 세포를 선별하여 제거하는 네가티브 선택을 가능하게 하는 마커로, 허피스 심플렉스 바이러스-싸이미딘 키나제 (Herpes simplex virus-thymidine kinase: HSV-tk), 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase: Hprt), 싸이토신 디아미네즈 (cytosine deaminase), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin) 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 네가티브 선별마커는 제1 영역의 5' 말단 쪽 또는 제2 영역의 3' 말단 쪽에 위치한다

          상기의 벡터와 게놈상의 베타-카제인 유전자가 상동 재조합이 일어나면 벡터상의 목적 단백질을 코딩하는 핵산이 숙주세포의 베타-카제인 게놈 유전자로  
15           통합(integration) 되어, 숙주 세포의 베타-카제인 프로모터에 의해 베타-카제인 단백질 대신 발현된다.

          게놈상의 특정 유전자와 목적 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 상동 재조합으로 통합(integration)되는 효율은 타겟팅 벡터 시스템, 특히 두 재조합 서열 사이의 동일  
20           정도와 상동 표적 서열의 길이에 많이 좌우된다(Scheerer et al., Mol Cell Biol., 14(10):6663-6673, 1994; Thomas et al., Cell, 51(3):503-512, 1987; Hastly et al., Mol Cell Biol., 11(11):5586-5591, 1991; Lu et al., Blood, 102(4):1531-1533, 2003). 본 발명은 상기 요소를 고려하여, 제1 영역과 제 2 영역의 상동 표적 부위와 길이를 최적화하여 벡터의 효율을 최적화하였다는 점에서 의의가 높다. 실제로 본 발명의 벡터 시스템을 이용할 경우, 베타-카제인 유전자가 전혀 발현되지 않는 체세포에서도  
25           효율적으로 상동 재조합이 유도되었으며, 게놈상의 베타-카제인 유전자와 목적 단백질을 코딩하는 핵산을 안정적으로 통합시켰다.

          본 발명의 구체적인 양태에서, 베타-카제인 타겟팅 벡터로 pBCKI I 와 pBCKI II 벡터를 제조하였다.

30           pBCKI I 은 pBluescript II SK(+) 플라스미드 골격의 18.8 kb 길이를 가지는



벡터로 소 베타-카제인 유전자 프로모터를 포함하는 8kb와 엑손 1, 인트론 1 및 엑손 2를 가지는 총 10kb 정도의 제 1영역을 가진다. 제2 영역은 3.1 kb 정도의 길이로, 소 베타-카제인 유전자의 엑손 5, 6, 7, 8 과 인트론 5, 6, 7 과 인트론 단편 4, 8을 포함한다. 또한, pBCKI I 은 *Neo* 선별마커 영역을 가지며, SV40 초기 프로모터와 poly A를 가진다.

5 pBCKI I 벡터는 Sac II, Not I 및 BamH I 의 3개의 제한효소 위치를 가지고, 이 제한효소 위치로 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 간편하게 삽입할 수 있다 (도 1)

pBCKI II 는 pGEM7Zf(+) 플라스미드 골격의 14.8 kb 길이를 가지는 벡터로 소 베타-카제인 유전자 프로모터를 포함하는 4kb와 엑손 1, 인트론 1 및 엑손 2를 가지는 총 6kb 정도의 제 1영역을 가진다. 제2 영역은 3.1 kb 정도의 길이로, 소 베타-카제인 유전자의 엑손 5, 6, 7, 8 과 인트론 5, 6, 7 과 인트론 단편 4, 8을 포함한다. 또한, pBCKI I 은 *Neo* 선별마커 영역을 가지며, SV40 초기 프로모터와 poly A를 가진다. pBCKI I 벡터는 Sac II, Not I 및 BamH I 의 3개의 제한효소 위치를 가지고, 이 제한효소 위치로 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 간편하게 삽입할 수 있다 (도 2).

10

상기 벡터 제작은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

15

본 발명의 구체적인 양태에서는, 상기 pBCKI I 및 pBCKI II 로 인간 트롬보포이에틴 (TPO) 유전자를 삽입하였다(도 3 및 4). 0.3 kb 소 성장 호르몬 (bGH) 이 붙여진 1 kb 인체 트롬보포이에틴 (TPO) 유전자 cDNA 를 제작하였다 (Sohn et al., DNA Cell Biol., 18(11):845-852, 1999). 소 성장 호르몬은 mRNA를 안정적으로 발현시키기 위하여 삽입되었다. 인체 트롬보포이에틴은 혈소판 생산에 관여하는 거핵세포 (megakaryocyte)의 증식과 분화와 같은 거핵세포 발생 (megakaryocytopoiesis)의 중요한 조절인자 중 하나이다. 혈소판 생산의 주요한 조절자로서, 거핵세포 분화와 성숙을 촉진시키는 중추적인 역할을 한다. 과도한 화학요법과 골수이식 수술을 겪은 환자들은 심각한 호중구 감소증 (neutropenia)와 혈소판 감소증을 보인다 (Lok et al., Stem Cells, 12(6):586-598, 1994; Kaushansky et al., Stem Cells, 15(1):97-102, 102-103, 1997; Kaushansky et al., Ann Intern Med., 126(9):731-733, 1997; Kaushansky et al., Leukemia, 11(3):426-427, 1997; Kaushansky et al., Annu Rev Med., 48:1-11, 1997). 실험 동물 모델에서 재조합 트롬보포이에틴 (TPO) 단백질은 혈소판 감소증을 경감시키는 것으로 확인되었고, 치료

20

25

30

목적으로 사용될 수 있는 분명한 가능성 보였다. 트롬보포이에틴 (TPO) 유전자는 phase 1 임상실험에서 안정성과 효능이 검증되었다 (Fanucchi et al., N Engl J Med., 336(6):404-409, 1997; Bassier et al., Lancet., 348(9037):1279-1281, 1996; O'Malley et al., Blood, 88(9):3288-3298, 1996). 또한 트롬보포이에틴 유전자는 항암 화학요법을 받고 있는 myelosuppressed 환자의 혈소판 생산 능력을 회복 시키기 위해 사용될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

상기 두 벡터 중, 제1 영역이 약 6kb의 길이를 가지는 pBCKII가 게놈의 베타-카제인 유전자로 타겟팅되는 효율이 더 높다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 벡터로 유전자 타겟팅된 동물 세포에 관한 것이다.

본 발명의 벡터로 타겟팅 되는 세포는 진핵 생물 유래로, 1차, 2차, 또는 영구세포일 수 있다. 바람직하게는 소, 양, 염소, 돼지, 말, 토끼, 개, 원숭이 등의 동물 조직에서 유래한 세포이다. 세포를 분리하거나 활성화할 수 있는 유용한 조직에는 간, 신장, 비장, 뼈, 골수, 흉선, 심장, 근육, 허파, 뇌, 정소, 난소, 소도(islet), 내장, 골수, 귀, 피부, 뼈, 쓸개 조직, 전립선, 방광, 배아(embryo), 면역계 및 조혈계. 세포 타입은 섬유아 세포, 상피 세포, 신경 세포, 배아 세포, 간 세포, 및 여포 세포 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

상기 세포 내로 본 발명의 벡터를 도입 방법은 핵산을 세포내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 일렉트로포레이션 (electroporation), 칼슘 포스페이트 공동-침전 (calcium phosphate co-precipitation), 레트로바이러스 감염 (retroviral infection), 미세주입법 (microinjection), DEAE-덱스트란 (DEAE-dextran), 양이온 리포솜 (cationic liposome) 법 등이 있고, 이로 제한되지 않는다. 이 때 원형의 벡터를 적절한 제한효소로 절단하여 선형의 벡터 형태를 도입하는 것이 바람직하다.

본 발명의 구체적인 양태에서는, 소 배아 섬유아세포(bET)와 소 귀조직 섬유아세포(bESF)로 인간 트롬보포이에틴(hTPO) 유전자가 삽입된 베타-카제인 타겟팅 벡터를 Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen)을 사용하는 양이온 리포솜 법을 사용하여 타겟팅 하였다. 양이온 리포솜은 (-) 전하를 가지는 DNA와 효율적으로 결합하여 세포막에 결합하면서 DNA의 중성화를 이루고 결국 DNA는 세포 내로 도입된다.

그리고 벡터가 게놈의 베타-카제인 유전자로 정확하게 타겟팅 되었는지 여부는 항생제에 저항성을 가지고 살아남은 세포의 게놈 DNA를 long range PCR과 써던 블랏으로 확인하였다. 이런 과정을 통하여 bESF로 인간 트롬보포이에틴(hTPO) 유전자가 게놈의 베타-카제인 유전자로 정확하게 타겟팅 된 세포주를 제조할 수 있었다. 바람직하게는,  
5 기탁번호 KCTC 10720BP로 기탁된 세포이다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 동물세포로 핵이식된 수정란에 관한 것이다.

본 발명에서, “핵이식 (nuclear transfer)”은 어떤 세포의 핵을 이미 핵을 제거한 난자에 넣어 이식시키는 것을 의미하며, 이런 핵이식된 수정란을 착상시켜서 태어난  
10 개체는 핵공여 세포의 유전적 물질이 핵수여 세포질로 그대로 전달되었기 때문에 유전적으로 완전히 동일한 복제 개체이다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 벡터를 동물 세포내로 도입하는 단계; 목적 유전자가 상동 재조합에 의하여 유전자 타겟팅된 세포를 선별하는 단계; 동물 난자의 핵을 제거하고 유전자 타겟팅된 세포를 도입하는 단계를 포함하는 체세포 핵이식된 수정란을 제조하는 방법에 관한 것이다.  
15

난자의 유전 물질을 제거하는 방법에는, 물리적인 방법, 화학적인 방법, Cytochalasin B 를 사용한 원심분리법 등이 있다 (Tatham et al., Hum Reprod., 11(7):1499-1503, 1996). 본 발명에서는, 유리 마이크로피펫 (glass micropipette)을  
20 사용하면서, 물리적인 핵 제거 방법을 사용하였다.

유전자 타겟팅된 체세포는 세포막융합법, 세포질내미세주입법 등을 이용하여 핵이 제거된 난자내로 도입된다. 세포막융합법은 간단하며 대규모 수정란 생산에 적합하다는 장점이 있으며, 세포질내 미세주입법은 핵과 난자내 물질들과의 접촉을 극대화시킨다는 장점이 있다.

25 체세포와 핵이 제거된 난자와의 융합은 전기자극을 통하여 세포막의 점도를 변화시켜 융합시키는 방법을 통하여 재조합 한다. 이 때, 미세전류·전압을 자유롭게 조정할 수 있는 전기융합기를 이용하면 편리하다.

30 또 다른 양태로서, 본 발명은 제1항의 벡터를 동물 세포내로 도입하는 단계; 목적 유전자가 상동 재조합에 의하여 유전자 타겟팅된 세포를 선별하는 단계; 동물 난자의

핵을 제거하고 유전자 타겟팅된 세포를 도입하여 체세포 핵이식된 수정란을 제조하는 단계; 및 상기 수정란을 착상시켜 제조된 형질전환 동물로부터 우유를 생산하는 단계를 포함하여 목적 단백질을 우유로부터 수득하는 방법에 관한 것이다.

핵이식된 수정란은 활성화시켜 이식 가능한 단계까지 발생시킨 후 대리모로  
5 착상된다.

복제 수정란의 활성화는 수정란이 분열할 수 있도록 성숙과정에서 일시적으로 정지되어진 세포주기를 다시 가동시키는 것을 의미한다. 복제수정란 활성화를 위하여서는 세포주기 정지요소인 MPF, MAP kinase 등의 세포신호전달물질의 활성을 저하시켜야만 하는데, 이를 위하여서는 복제 수정란 내 칼슘이온 증가가 필수적이다.  
10 크게 전기적 자극에 의하여 세포막 투과도를 변형하여, 세포 외로부터 칼슘유입을 급격히 증가시키는 방법과 이노마이신(ionomycin) 및 6-DMAP 등의 화학적 물질을 이용하여 세포주기 정지요소의 활성을 직접적으로 저해시키는 방법 등이 단독 또는 병용되어지고 있다. 본 발명에서는 이노마이신과 6-DMAP를 처리하여 난자를 활성화시켰고 배반포 발달 단계까지 체외 배양되었다.

그 후 태어난 개체는 수유기에 베타-카제인 대신 목적 단백질을 발현하게 되는 형질전환된 동물이다. 즉, 상기의 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터가 타겟팅 된 세포를 이용해서 핵이식된 수정란을 착상시켜 형질동물을 만들 경우, 목적 단백질을 동물의 발달장애와 같은 부작용 없이 형질전환된 동물의 우유로부터 대량으로 획득할 수 있다.

우유에서 과다 발현되는 목적 단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 염석  
20 (예: 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전 등), 용매 침전(예: 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 칼럼 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 목적 단백질을 얻을 수 있다 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., Molecular  
25 Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990))

이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

## 5 실시예 1 - 유전자 타겟팅 벡터 제작

유전자 타겟팅 벡터 제작을 위하여 우유에서 외래 치료 단백질 유전자의 발현을 유도한다고 알려진 소 베타-카제인 프로모터 부위를 포함하고 있는 소 베타-카제인 유전자를 이용하였다.

10 pBC10 벡터는 (도 6) pBluescript II SK(+) plasmid (Stratagene) 벡터 내에 소 베타-카제인 유전자 5' 쪽 염기 서열 8 kb 프로모터와 엑손 1과 2 kb 인트론 1 그리고 엑손 2의 5'-UTR을 포함한다 (Sohn et al., J Biotechnol., 103(1);11-19, 2003). pBC 10 벡터의 베타-카제인 유전자 부위는 발명된 벡터 인, pBCKI I 및 pBCKI II의 통 암 (제1 영역에 해당)으로 사용되었다. 도 7에서 보여진 바와 같이 10 kb 베타-카제인  
15 유전자를 Sac I 과 Sac II 제한효소로 절단하고, 이를 pBCKI I 벡터의 제1 영역으로 사용하였다 (도 11). Aat II와 Sac II 제한효소로 절단된 소 베타-카제인 유전자의 4 kb 프로모터, 해독되지 않는 엑손 1, 2 그리고 인트론 1을 포함하는 6kb 베타-카제인 프로모터 부위는 pBCKI II의 통 암 (제1 영역에 해당)으로 사용하였다(도 11).

20 BC3.1 벡터 (도 9)는 본 발명의 제2 영역에 해당하는 부위를 포함한다. 소 게놈 DNA로부터 엑손 5, 6, 7, 8과 인트론 5, 6, 7 과 인트론 절편 4, 8를 포함하고 있는 소 베타-카제인 유전자 염기 서열 4676 부터 7898까지의 3.2 kb DNA단편을 PCR를 통해 증폭하였다. PCR 반응을 위해 사용된 프라이머의 염기 서열은 다음과 같다.

서열번호 1 Forward primer: 5' - attcagtcgagtggaaacataaactttcagcc - 3'

25 서열번호 2 Reverse primer: 5' - catatgtcgactgtgagattgtattttgact - 3'

굵은 글씨체는 Xho I, Sal I 제한효소 위치를 만들기 위해 바뀐 염기를 가리킨다.

30 PCR 산물 (도 9)은 Xho I 과 Sal I 제한효소에 의해 자른 후, pGEM-T (Promega) 벡터의 Sal I 부위로 연결하였다. pBC10 벡터로 삽입하기 위한 적당한 제한효소 위치를 만들기 위하여, pGEM-T 벡터 안에 있는 3.2 kb 소 베타-카제인 유전자

단편을 Hinc II와 Sal I 제한효소를 이용하여 잘랐다. 그 베타-카제인 유전자 3.1 kb 단편은 pBluescript IISK(+)의 Sal I 부위에 연결하였고, 그 결과 BC3.1 벡터를 완성하였다.

- 5 선별마커로써 사용되는 *neo* 유전자 단편을 pBC10 벡터로 삽입하였다. SV40 *ori*, 초기 프로모터와 SV40 초기 스프라이싱 영역, polyadenylation 부위를 포함하는 *neo* 유전자 단편을 얻기 위하여, pMAM*neo* (CLONTECH) 벡터를 사용하였다. pMAM*neo*를 BamH I 제한효소를 이용하여 절단하고 얻은 2.7 kb DNA 단편을 pBluescript IISK(+)의 BamH I 부위에 연결하고, 연결된 벡터 안에 있는 2 kb *neo* 유전자 단편을 Bgl II와 BamH I 제한효소를 이용하여 자른 후, pSP73 (Promega) 벡터의 Bgl II 부위로 연결하였다. 마지막으로, pSP73 안에 있는 2 kb *neo* 유전자 단편은 Bgl II 와 EcoRV 제한효소를 이용하여 자른 후, 0.7 kb pMAM*neo* 유전자 단편을 가지고 있는 pBluescript IISK(+)의 Bgl II 와 EcoRV 부위로 다시 연결하였다. 이러한 DNA 자르고 연결하는 과정은 pBC10 벡터 내로 2.7 kb *neo* 유전자 단편을 삽입하기 위하여
- 10
- 15 요구되었다 (도 10).

- 도 11에서 보여진 것처럼, pBCKI I, pBCKI II 벡터 카세트는 pBC10 벡터 내로 p*neo*2.7 과 pBC3.1의 유전자 단편을 조립하여 넣음으로써 완성하였다. pBluescript IISK(+)안에 있는 *neo* 유전자를 BamH I, EcoRV 제한효소로 자른 후,
- 20 pBC10 벡터의 Bam H I, EcoRV 제한효소 위치로 연결하였다. pBC3.1 벡터는 EcoRV, Sal I 제한효소로 자른 후, pMAM*neo* 유전자 단편을 가지고 있는 pBC10 벡터의 EcoRV, Sal I 인식부위로 연결하였고, 그 결과 pBCKI I 벡터를 완성하였다. pBCKI I 벡터 카세트를 Aat II, Sal I 제한효소로 자른 후, pGEM-7Zf (Promega)의 Aat II, Xho I 인식 부위에 연결하였으며, 그 결과 pBCKI II 벡터 카세트를 완성하였다.

25

PCR에 의해 합성되거나 또는 연결된 DNA 단편을 효소 맵핑 (enzyme mapping)과 시퀀싱하여 상기의 베타-카제인 타겟팅 벡터가 정확하게 제작되었는지 확인하였다.

- 30 실시예 2 - pBCTPOKI I 와 pBCTPOKI II 벡터 제작

도 12, 13에서 보여지는 것 처럼, 300 bp 소 성장 호르몬 유전자와 함께 1 kb 인체 트롬보포이에틴 (hTPO) 유전자를 pBCKI I와 pBCKI II 벡터 카세트에 삽입하였다. Sac II와 Not I 제한효소 위치를 가지고 있는 그 1.3 kb 외래 유전자를 pBCKI I, pBCKI II 벡터의 Sac II와 Not I 제한효소 위치로 연결하였고, 그 결과, pBCTPOKI I, pBCTPOKI II 벡터 구조물을 완성하였다.

실시에 3 - BCTPOKI I와 BCTPOKI II를 소 배아 섬유 아세포 (bEF) 와 소 귀조직 섬유 아세포 (bESF) 내로 도입

플라스미드 DNA인 pBCTPOKI I와 pBCTPOKI II를 "QIAfilter Plasmid Midi kits" (Qiagen)를 이용하여 정제한 후, 원형 DNA를 CsCl-에티디움 브로마이드 농도구배 (CsCl-ethidium bromide gradient)에 의한 평형원심분리를 통하여 분리하였다. 분리된 pBCTPOKI I 와 pBCTPOKI II 플라스미드를 각각 제한효소 Sal I (도 14) 과 Aat II (도 15)로 잘라서 선형화하였다. 에탄올 침전과정을 통해 정제된 DNA의 농도를 분광광도기 (spectrophotometer)를 이용하여 측정하였다.

선형화된 pBCTPOKI I와 pBCTPOKI II 구조물을 계대 2 또는 3인 bEF 와 bESF 세포로 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)을 이용하여 도입하였다. BEF는 각 2, 4, 10  $\mu$ l 농도별의 transfection reagent와 2, 4  $\mu$ g DNA 농도별로 트랜스펙션을 테스트 하였다. BESF는 2, 4, 10  $\mu$ l 농도별의 transfection reagent와 1, 2, 4  $\mu$ g DNA 농도별로 트랜스펙션을 테스트 하였다. 세포들은 transfection reagent-DNA 복합체에 24시간 동안 노출시켰다.

DMEM (Gibco, Invitrogen corporation), 10% FBS (Hyclone), 0.001% 겐타마이신 (Gibco, Invitrogen corporation), 1% MEM 비필수 아미노산 (Gibco, Invitrogen corporation) 조성의 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 세포를 배양하고 배양액은 매일 교환하였다. 배양액 분량은 하기표와 같이 세포 배양 용기에 따라 조절하였다.

96 웰	48 웰	24 웰	12 웰	6 웰	100 mm 디쉬
0.2 ml	0.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	3 ml	10 ml

5        싹 차게 자란 세포는 1 x Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen corporation) 용액을 이용하여 37℃ 조건에서 3 분 동안 두어서 세포를 배양 용기로부터 떼어낸 후, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Gibco, Invitrogen corporation)을 이용하여 세포를 두 번 세척한다. 1 x Trypsin-EDTA 처리를 통해 용기로부터 떨어진 세포주들을 천천히 피펫팅하여 각각의 세포로 떨어뜨린 후, 좀 더 넓은 배양 용기로 옮겨 증식시켰다. 사용하는 1 x 트립신-EDTA 용액의 분량은 하기표와 같이 배양 용기 형태에 따라 달리하였다.

96 웰	48 웰	24 웰	12 웰	6 웰	100 mm 디쉬
50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	150 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml

10

실험 순서는 다음과 같다:

Day 1 : 계대 2 또는 3인  $5.5 \times 10^5$  bEF 세포와  $3.6 \times 10^5$  bESF 세포를 6-웰(well) 배양 용기에 준비한다. 사용 설명서에 의해 추천된 순서에 따라 2ml의 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco, Invitrogen corporation)과 Lipofectamine 15 2000 reagent (Invitrogen)을 사용하여 선형화된 BCTPOK I, BCTPOK II DNA를 세포내로 도입하였다.

Day 2: 유전자 도입된 6 웰 용기에 있는 세포들을 100 mm 배양 용기 2개로 나누어 배양하였다.

Day 3: 0.8 내지 1.5 mg/ml G418 (Gibco, Invitrogen corporation) 을 배양액에 20 첨가하였다.

Day 4 내지 14: 지름이 약 2 내지 3 mm 정도의 콜로니만을 골라 각각 내어 96 웰 배양 용기의 각 웰에 넣어 배양하였다.

25        96 웰 배양용기 상에서 싹 차게 자란 세포들을 48 웰 배양용기로 계대 배양 후, 점차적으로 24 웰, 12 웰, 6 웰, 그리고 100 mm 배양 용기로 옮겨 배양하였다. 6 웰 배양 용기에서, 세포의 반은 PCR 반응을 위해 사용되고, 나머지는 6 웰 배양 용기의 2개



웰로 나누어 배양하였다

#### 실시예 4 - 각각의 세포주에 대한 PCR 분석

G418 항생제에 저항성을 가지는 각각의 세포주에 외래 유전자 도입여부 또는 형질 전환 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 하였다. "AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit" (Bioneer) 을 사용하여 6 웰 배양 용기에서 배양된 세포의 반으로부터 게놈 DNA를 추출하였으며, "AccuPower PCR Premix" (Bioneer)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 인체 트롬보포이에틴 유전자 (hTPO)에 대한 프라이머 세트와 thermal cycling 조건은 다음과 같다.

서열번호 3 Forward primer : 5'-ggagctgactgaattgctcctcgt-3'

서열번호 4 Reverse primer : 5'-cctgacgcagagggtggaccctcc-3'

1 cycle of	94℃	2 min
30 cycles of	94℃	1 min
	65℃	30 sec
	72℃	45 sec
1 cycle of	72℃	10 min

G418 항생제에 저항성을 가지는 대부분의 세포주는 형질전환임을 PCR 결과로 알 수 하였다 (도 17).

#### 실시예 5 - 유전자 타겟팅 여부 확인을 위한 Long-range PCR 분석

형질전환된 세포주 중 유전자 타겟팅된 세포주를 확인하기 위해 Long-range PCR을 수행하였다. 형질전환 세포주의 게놈 DNA를 "AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit" (Bioneer)을 이용하여 추출하였고, "AccuPower HL PCR Premix"(Bioneer)을 이용하여 PCR을 수행하였다.

도 5에서 보여진 바와 같이, 벡터 구조물 내에 있는 neo 유전자의 3' 말단에

결합하도록 5' 프라이머를 준비하였으며, 3' 프라이머는 벡터 구조물에는 포함되지 않는 내생적 (endogenous) 소 베타-카제인의 인트론 8에 결합하도록 준비하였다. 유전자 타겟팅된 세포주는 1 % 아가로스 겔에서 4 kb PCR 산물로 확인가능하다. 프라이머 세트의 염기 서열과 thermal cycling 조건은 다음과 같다.

5

서열번호 5 Forward primer: 5'- ccacacaggcatagagtgtctgc - 3'

서열번호 6 Reverse primer: 5'- ccacagaattgactgcgactgg - 3'

10

1 cycle of	92℃	2 min
35 cycles of	92℃	20 sec
	65℃	45 sec
	68℃	3 min
1 cycle of	68℃	10 min

15

long-range PCR 분석 결과, 2개의 세포 클론이 유전자 타겟팅되었음을 확인할 수 있었다 (도 20).

20

실시에 3 및 실시에 4에 의하면 체세포로 BCTPOKI I 벡터를 도입시킨 후, 총 41 개의 세포주를 선별하였고, 그 중에서 38개 (93%)의 세포주가 형질전환인 것으로 확인되었으며, 유전자 타겟팅된 세포주 (0 %) 는 얻을 수가 없었다. BCTPOKI II 벡터를 세포로 도입시킨 후 31개의 세포주를 선별하였고, 그 중에서 29개 (94%)가 형질전환 있었으며, 2개 (7%)의 유전자 타겟팅된 세포주를 획득했다 (표 1 및 도 22).

표 1. BCTPOKI I 과 BCTPOKI II 벡터의 유전자 도입 빈도 비교

	세포 종류	BCTPOKI I		BCTPOKI II	
분석된 세포주 수	bEF	23	41	2	31
	bESF	18		29	
형질전환된 세포주 수	bEF	22 (96%)	38 (93%)	1 (50%)	29 (94%)
	bESF	16 (89%)		28 (97%)	
유전자	bEF	0 (0%)	0 (0%)	0	2 (7%)

타겟팅된 세포주 수	bESF	0 (0%)		2	
---------------	------	--------	--	---	--

#### 실시에 6 - 유전자 타겟팅 여부 확인을 위한 써던 블랏 (Southern blot) 분석

PCR 분석에 의해 유전자 타겟팅된 것으로 확인된 2개의 콜론을 써던 블랏으로 재확인하였다. 각 세포 클론을 2개의 100 mm 배양 용기로 확장 배양한 후, 그 중 하나는 게놈 DNA를 추출하기 위하여, 세포를 모아서 최소한 10 $\mu$ g DNA를 각각의 클론으로부터 추출하였다. 그 후 37 $^{\circ}$ C 조건에서 16시간 동안 EcoR1 제한효소로 제한하였다. EcoR1으로 제한된 DNA를 16시간 동안 1x TAE 버퍼에서 50V에서 0.75% 아가로스 젤 상에 전기 영동 함으로써 분리하였다. 그 DNA를 양전하를 가지는 막 (membranes positively charged: Boehringer Mannheim)으로 옮겨, 인간 TPO cDNA (도 21)가 있는 벡터 구조물에 대한, 지침서에(Roche) 따라 Random primed DIG-labeling 기술을 이용하여 제작된 프로브로 하이브리제이션을 수행하였다. 써던 블랏용 프로브는 서열번호 3 및 4의 프라이머를 이용하여 PCR DIG labeling mix (Roche) 과 Taq DNA 폴리머라제 (QIAGEN)을 사용하여 제작되었다. PCR 반응의 thermal cycling의 조건은 다음과 같다.

1 cycle of	94 $^{\circ}$ C	3 min
30 cycles of	94 $^{\circ}$ C	45 sec
	52 $^{\circ}$ C	30 sec
	72 $^{\circ}$ C	1 min <sup>20</sup>
1 cycle of	72 $^{\circ}$ C	10 min

PCR 반응으로 선정된 두 개의 세포주가 소 베타-카제인 유전자 타겟팅되었음을 재 확인하였다 (도 22). 81번, 89번의 2개 세포주는 발명한 벡터가 게놈의 소 베타-카제인 유전자 위치로 타겟팅되었음이 재확인되었다.

이 중에서 81 번 클론을 BCTPOK1bESF81 이라 명명하였고, KCTC(Korean Collection for Type Cultures, 대한민국 대전 유성구 어은동 52)에 2004 년 11 월 10 일자로 제 KCTC 10720BP 호로 기탁하였다.

## 실시예 7 - 소 체세포 준비

대한민국의 축산 연구소의 동물관리 지침에 따라서 이 실험들을 수행하였다. 소 배아 섬유아세포 (bEF)를 임신 후 45일째 되는 태아로부터 분리하여 이미 보고된 논문

5 따라 세포를 준비하였다 (Koo et al., Biol Reprod., 63(4):986-992, 2000). 태아의 머리는 해부용 가위를 사용하여 제거하였으며, 간과 내장 같은 부드러운 조직은 두 개의 watchmarker's forceps으로 끊어서 제거하였다. 소 귀조직 섬유아세포 (bESF)는 일년에 12,000kg 이상 우유를 생산하는 태어난 지 2년 된 소의 귀로부터 분리하였다. PBS

10 (Gibco BRL)로 두 번 세척 이후, bEF 와 bESF를 100 mm 배양 용기상에서 해부용 칼을 이용하여 잘게 썰었다. 이 실험 절차는 상온에서 수행하였다. 잘게 썰어진 조직들을 0.05% (w/v) 트립신/0.53 mM EDTA 용액 10 ml 에 넣고 30분 동안 38.5℃ 배양기에서 배양하였다. 동량의 10% FBS를 포함 하고 있는 세포 배양액을 첨가하여 트립신의 활성을 억제하였다. 세포 배양액은 DMEM, 10% FBS, 페니실린 1000 유닛, 스트렙토마이신

15 1000 µg/ml (Gibco BRL)으로 조성하였다. 강한 피펫팅을 한 후, 5분 동안 150 x g조건으로 원심분리 하였다. 세포들을 부유 시킨 후,  $2 \times 10^6$  cells/ml 정도의 세포 농도를 가지게 농도를 조정하여 175-cm<sup>2</sup> 조직 배양 용기 (Nunc, Roskilde, Denmark)에 팍 차게 자랄 때까지 37℃, 5% CO<sub>2</sub>조건으로 10 ml 배양액을 넣어 배양하였다. bEF 와 bESF 세포를 20% FBS 와 10% Dimethyl sulphoxide을 포함하고 있는 차가운

20 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline solution을 이용하여 동결 시킨 후 16시간 동안 -70℃에 보관한 다음, 외래 유전자 도입 실험을 수행할 때까지 액체 질소 속에 보관하였다.

유전자 타겟팅된 세포주를 얻기 위해서는, DNA가 도입된 세포가 노화나 변형 없이 체외배양 시스템에서 오랫동안 생존할 수 있어야 한다. 본 발명에서, BCTPOK I I

25 와 BCTPOK I I I 벡터는 소 배아 섬유아세포 (bEF)와 소 귀 조직 섬유아세포 (bESF)로 도입되었다. 양의 경우, 출생된 양의 섬유아세포가 배아 섬유아세포보다 체외배양에서 더 안정적인 염색체 수를 보이면서 오랫동안 지속된다는 것이 보고 되었다 (Williams et al., Mol Reprod Dev., 66(2):115-125, 2003). 본 발명에서, 소 귀조직 섬유아세포 (bESF)는 소 배아섬유아세포 (bEF)보다 체외배양에서 형태 변화 없이 좀 더 오랫동안 배양되었다 (표 2).

30

표 2 세포주 계대 배양에 따른 생존율

세포 종류	세포주 수		생존 율
	계대 4	계대 8	
소배아섬유아세포 (bEF)	149	9	6%
소귀조직섬유아세포 (bESF)	304	51	17%

계대 4에 있는 304개의 소 귀조직 섬유아세포 유래의 세포주 중에서 51개 (17 %)의 세포주가 계대 8까지 정상적인 모양을 보이면서 체외배양 되었다. 반면, 소 배아 섬유아세포 경우, 단지 6 % (9/149)의 세포주만이 계대 8까지 배양되었다. 상기 실시예에서 획득한, 유전자 타겟팅된 2개의 세포주는 소귀조직 섬유아세포 유래임을 알 수 있다.

#### 실시예 8 - 유전자 타겟팅된 세포의 해동 및 동결

유전자 타겟팅된 세포를 두 개의 100 mm 배양용기에서 꼭 찰 때까지 배양하여, 그 중 한 배양용기 안에 있는 세포는 써던 블랏 분석을 수행하였다. 남은 다른 용기 내 세포의 반을 계속 배양하며 나머지 반은 16시간 동안 -70℃에서 동결 후 액체질소에 보관하였다. 핵공여 세포로 이용하기 위한 가능한 한 많은 수의 세포를 확보하기 위하여 계대 배양과 보관 과정을 반복하였다. 세포 동결액은 20% FBS와 10% DMSO (dimethyl sulphoxide)을 포함하는 DMEM으로 조성하였다.

동결 되어 있는 유전자 타겟팅된 세포가 들어있는 1개의 튜브를 가능한 한 빨리 해동한 후, 9 ml 배양액을 넣은 15 ml 튜브로 그 해동액을 넣고 3분 동안 1000 rpm에서 원심분리 하였다. 세포 침전물을 3 ml 배양액에서 부양시킨 후, 6-웰 배양 용기에 넣어 핵이식에 이용될 때까지 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 배양기에서 배양하였다.

#### 실시예 9 - 핵이식

소 난자들을 도살장 난소로부터 획득하여 38.57℃, 5% CO<sub>2</sub>와 수분이 있는 상태에서 22시간 동안 성숙 배양액에서 배양하였다. 성숙 배양액은 Eagle salts 와 10% (v/v) FBS (Gibco BRL, Grand Island, NY)가 보충된 L-글루타민과 1 µg/ml 에스트라디올

(estradiol), 1  $\mu$ g/ml FSH-P (Schering-Plough Animal Health Corp., Kenilworth, NJ)와 25 mM NaHCO<sub>3</sub>와 TCM-199 (Sigma Chemical Co.)으로 조성하였다. 체외 성숙시킨 후, 난자들을 0.1% 히아루니다제 (hyaluronidase)가 들어있는 500 $\mu$ l TL-Hepes에 넣어서 난자의 큐무러스 (cumulus)를 강한 피펫팅으로 제거하였다. 큐무러스 세포가 제거된 난자의 투명대를 정교한 유리 침을 사용하여 부분적으로 절개하였다 (Tsunoda et al., J Exp Zool., 240(1):119-125, 1986). 핵 제거와 세포 삽입 같은 난자 조작은 역상 현미경 (Leitz, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Germany)이 장착된 micromanipulator 통해 수행하였다. 조작을 위해 사용된 배양액은 7.5  $\mu$ g/ml 사이토칼라신 B (cytochalasin B)을 포함하고 있는 TL-Hepes이다. 첫 번째 극체와 metaphase II 염색체를 포함하고 있는 부분적인 세포질을 20  $\mu$ m 직경을 가진 마이크로피펫을 이용하여 제거하였다. 한 개의 유전자 타겟팅된 세포를 각각 수용체의 세포질체 (recipient cytoplasm)의 위란강으로 넣었다. 세포-세포질체 (cell-cytoplasm) 복합체를 10 내지 20초 동안 50  $\mu$ l 세포 융합 배양액 안에 둔 후, 세포 융합 배양액이 덮인 2개의 electrodes 1mm apart가 있는 융합용기에 옮겼다. 세포 융합 배양액은 0.3 M mannitol, 0.5 mM Hepes, 0.01% BSA, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>으로 조성하였다. cell-cytoplasm 복합체를 Electro Cell Manipulator 2001 (BTX, San Diego, CA)으로 각각 20  $\mu$ sec 동안 직접적인 1.6 kV/cm으로 전류를 흐르도록 한번의 펄스로 융합을 유도하였다. 이러한 과정은 상온에서 실시하였다. 체세포가 보이지 않는 재구성된 수정란은 융합 펄스 이후 1시간 되었을 때 융합된 수정란으로 결정된다. 전기적 융합 이후 4시간이 지난 후, 융합된 수정란을 5분 동안 5  $\mu$ M 이노마이신 처리하여 활성화 시킨 후, 10% FBS가 들어있는 CR1aa medium (Rosenkrans et al., Biol Reprod., 49(3):459-462, 1993)에 2.5 mM 6-디메틸-아미노퓨린을 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 3.5시간 동안 처리한다.

#### 실시예 10 - 재구성된 수정란 배양

재구성된 수정란을 1 mM 글루타민과 1x 이글 필수 아미노산 용액 (Gibco BRL)이 들어있는 CR1aa 배양액에서 배양하였다. 3일 동안 배양 후, 분열된 수정란들을 마우스 배아 섬유아세포 모노레이어 (mouse embryonic fibroblasts monolayer) 위에서 750  $\mu$ l CR1aa (with 10% FBS)이 있는 4 웰 배양용기의 각 웰에서 4일 동안 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다 (Park et al., Anim Reprod Sci., 59(1-2):13-22, 2000). 배양

7일 이후, 포배기 형성이 관찰되었다.

#### 실시에 11 - 재조합 된 수정란의 PCR 분석

- 5            각 수정란을 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH8.5, 0.5% Nonidet P40, 0.5% Tween, 400 µg/ml Proteinase K 으로 조성된 라이시스 버퍼 20 µl 안에 넣은 후, 30분 동안 65℃ 조건에서 두었다. 그리고 반응을 10분 동안 95℃에 덂으로써 Proteinase K 활성을 중지시켰다 (McCreath et al., Nature, 405(6790):1066-1069, 2000). 용해된 각각의 수정란으로 첫 번째 PCR은 서열번호 3 및 4의 프라이머로
- 10            AccuPower PCR Premix" (Bioneer)을 이용하여 수행한 후, nested PCR을 첫 번째 PCR 산물 1 µl을 이용하여 수행하였다. 서열번호 3 및 7의 프라이머를 사용하였으며 thermal cycling 조건은 다음과 같다:

#### Nested PCR

- 15            서열번호 7 Reverse primer: 5'-gagacggacctgtccagaaagctg-3'

20

1 cycle of	94℃	2 min
30 cycles of	94℃	1 min
	65℃	30 sec
	72℃	45 sec
1 cycle of	72℃	10 min

다양한 발달 단계에 있는 재조합된 복제 배아의 PCR로 살펴본 형질전환 여부는 다음과 같다 (표 3).

25

표 3 수정란의 발달 단계에 따른 형질전환 여부 분석

	발달 단계							
	1 세포	2 세포	4 세포	8세포	16세포	낭배기	배반포	총
분석된 배아 수	3	3	6	11	2	3	5	33
형질전환 배아 수	3	3	6	11	2	3	5	33

33개의 복제된 배아 중에서 33개 (100%) 모두 형질전환 된 것 알 수 있고, 그 결과 발명이 본 유전자 타겟팅된 체세포를 사용함으로써, 유전자 타겟팅된 복제 동물을 생산을 위해 이용될 수 있다는 것을 의미한다

- 5           도 23은 81번 세포주의 세포로부터 핵이식된 수정란의 PCR 분석 결과 이다 (도 23).

#### 실시예 12 - 복제된 태아 유래인 태반 세포의 long-range PCR 분석

- 10           포배기 단계에 있는 복제 수정란은 비 수술적인 방법을 사용하면서, 임신 준비된 어미소로 이식하였다. 이식 후, 임신 36일로 확인된 어미소의 자궁으로부터 Foley catheter (Agtech, Manhattan, KS)를 사용하면서, 비 수술적인 방법으로 태박과 함께 태막에 둘러 쌓여 있는 태아를 추출하였다. 태아와 태아에서 유래인 태막조직을 실시예 7과 동일한 방법으로 세포 배양하였다. 그리고 세포 배양한 태막조직을 long-range PCR
- 15           방법으로 베타-카제인 유전자 타겟팅을 확인한 결과, 나타내는 4 kb 밴드를 통하여 베타-카제인 유전자 타겟팅되었음을 알 수 있다 (도 24). 게놈 DNA 추출과정과 long-range PCR 방법은 상기 실시예 5와 동일하다.



### 산업상 이용가능성

본 발명의 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터가 타겟팅 된 세포를 이용해서 핵이식된 수정란을 착상시켜 형질동물을 만들 경우, 의학, 산업적으로 유용한 고부가가치 단백질을 동물의 발달장애와 같은 부작용 없이 형질전환된 동물의 우유로부터 대량으로 획득할 수 있다.

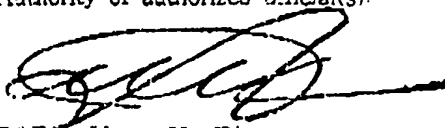
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT  
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

## INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT**

issued pursuant to Rule 7.1

TO : HAN, Yong-Mahn  
 Hanul Apt. 110-305,  
 Sinsong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-345,  
 Republic of Korea

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  BCTPOKIBESF81 (primary cell line)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  KCTC 10720BP
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>Nov 10 2004</b> .	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: Korean Collection for Type Cultures  Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yuseong-gu, Taejeon 305-333, Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):   PARK, Yong-Ha Director Date: Nov 15 2004

## 특허청구 범위

1. (1) 베타-카제인 유전자의 프로모터를 갖고 이 프로모터의 전후에 위치한 베타-카제인 유전자의 핵산 서열에 상동인, 5 내지 12kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제1 영역, (2) 목적 단백질 코딩하는 핵산 클로닝 부위, (3) 포지티브 선별마커 영역, 및 (4) 베타-카제인 유전자 핵산 서열에 상동인 2 내지 4kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제2 영역을 포함하고, 제1 영역이 베타-카제인 유전자의 핵산 서열의 5'-3' 배열에 있어 상부(upstream)에 해당하고 제2 영역이 하부(downstream)에 해당함을 특징으로 하는 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터.
2. 제1항에 있어서, 제1 영역이 5.5 내지 10kb의 길이를 가지는 벡터
3. 제1항에 있어서, 제2 영역이 2.5 내지 3.5kb의 길이를 가지는 벡터
4. 제1항에 있어서, 베타-카제인이 소, 양, 염소, 돼지, 말, 토끼, 개 또는 원숭이의 베타-카제인인 벡터.
5. 제1항에 있어서, 제1 영역이 소 베타-카제인 엑손 1, 2 및 인트론 1을 포함하는 벡터.
6. 제1항에 있어서, 포지티브 선별마커가 네오마이신 (Neomycin: Neo), 하이그로마이신 (hygromycin: Hyg), 히스티딘올 디하이드로게나제(histidinol dehydrogenase gene: hisD) 또는 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (guanine phosphosribosyltransferase: Gpt) 인 벡터.
7. 제1항에 있어서, 목적 단백질이 트롬보포이에틴, 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 콜로니 자극인자류, 글루카곤-유사 펩타이드류 (GLP-1등), 지프로테인 관련수용체 (G-protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 효소류, 인터루킨 결합 단백질류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자,

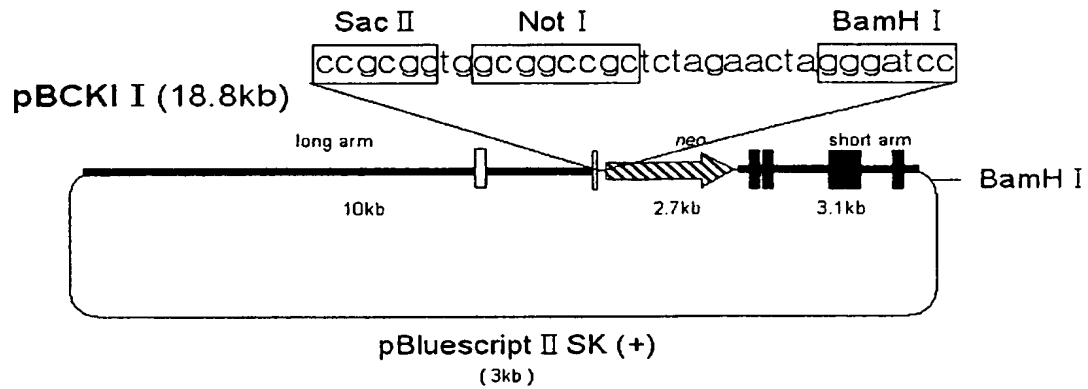
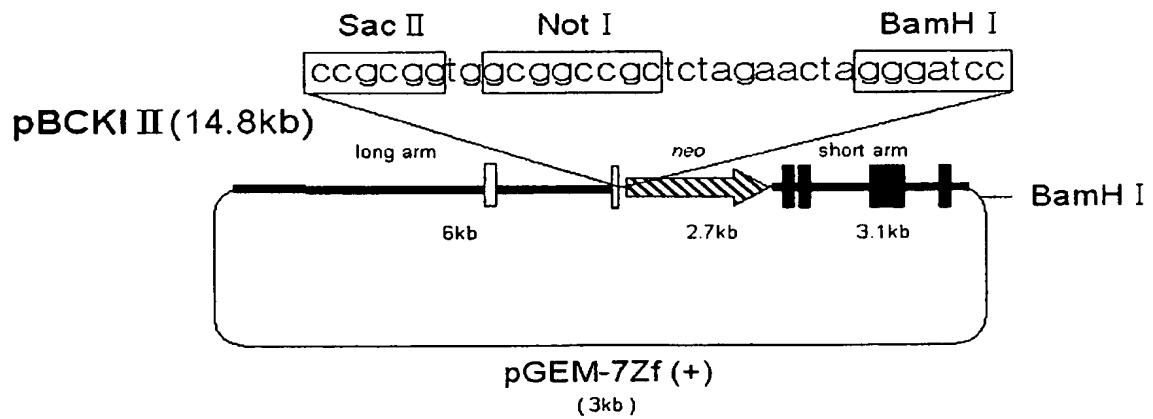
- 중양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α-락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오펙테아틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제,
- 5 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 랩틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류,
- 10 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토락신, 락토펙린, 미오스타틴, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 벡터.
- 15
8. 제1항에 있어서, 네가티브 선별마커를 추가로 포함하는 벡터.
9. 제1항에 있어서, 도 2에 개시된 pBCKII인 벡터.
- 20
10. 제1항의 벡터로 유전자 타겟팅된 동물 세포.
11. 제10항에 있어서, 기탁번호 KCTC 10720BP로 기탁된 세포.
12. 제10항의 동물세포로 핵이식된 수정란.
- 25
13. 제1항의 벡터를 동물 세포내로 도입하는 단계; 목적 유전자가 상동 재조합에 의하여 유전자 타겟팅된 세포를 선별하는 단계; 동물 난자의 핵을 제거하고 유전자 타겟팅된 세포를 도입하는 단계를 포함하는 체세포 핵이식된 수정란을 제조하는 방법.
- 30
14. 제1항의 벡터를 동물 세포내로 도입하는 단계; 목적 유전자가 상동 재조합에 의하여

유전자 타겟팅된 세포를 선별하는 단계; 동물 난자의 핵을 제거하고 유전자 타겟팅된 세포를 도입하여 체세포 핵이식된 수정란을 제조하는 단계; 및 상기 수정란을 착상시켜 제조된 형질전환 동물로부터 우유를 생산하는 단계를 포함하여 목적 단백질을 우유로부터 수득하는 방법.

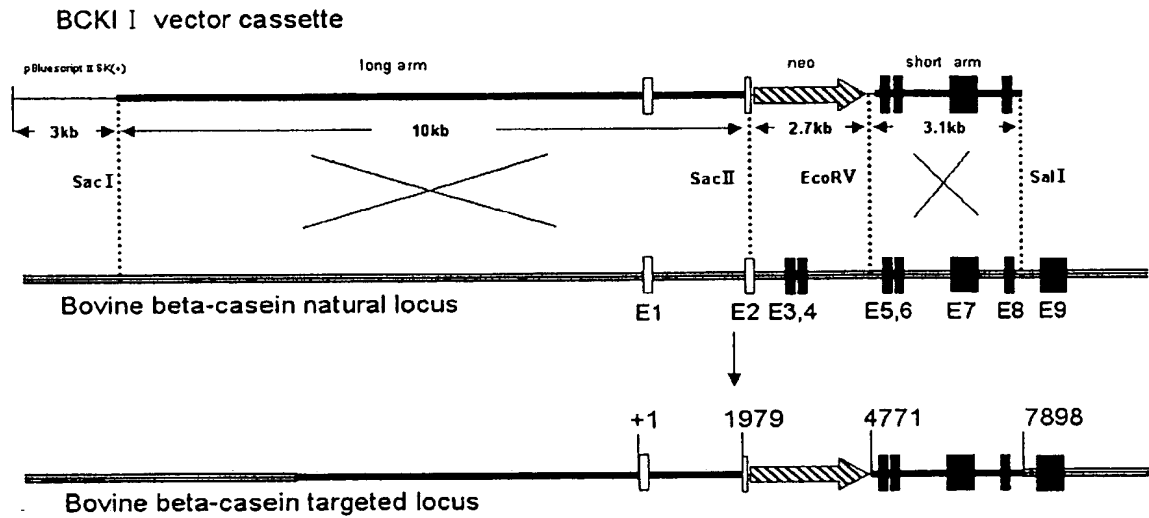
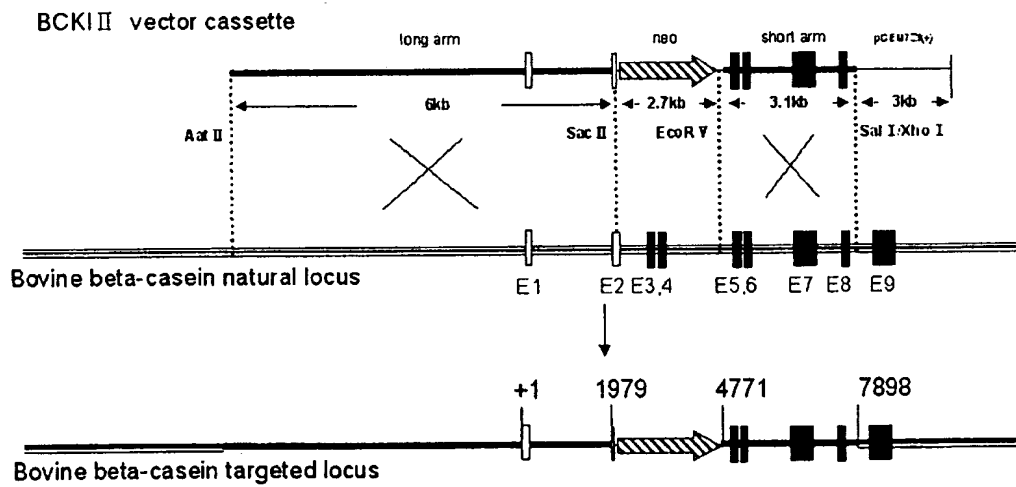
## 요약서

본 발명은 (1) 베타-카제인 유전자의 프로모터를 갖고 이 프로모터의 전후에  
 위치한 베타-카제인 유전자의 핵산 서열에 상동인, 5 내지 12kb 길이의 핵산 서열을 갖는  
 5 제1 영역, (2) 목적 단백질 코딩하는 핵산 클로닝 부위, (3) 포지티브 선별마커 영역, 및  
 (4) 베타-카제인 유전자 핵산 서열에 상동인 2 내지 4kb 길이의 핵산 서열을 갖는 제2  
 영역을 포함하고, 제1 영역이 베타-카제인 유전자의 핵산 서열의 5'-3' 배열에 있어  
 상부(upstream)에 해당하고 제2 영역이 하부(downstream)에 해당함을 특징으로 하는  
 베타-카제인 유전자 타겟팅 벡터, 상기 벡터로 유전자 타겟팅된 동물 세포 및 상기  
 10 동물세포로 핵이식된 수정란에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 수정란을 착상시켜  
 제조된 형질전환된 동물의 우유로부터 목적 단백질을 수득하는 방법에 관한 것이다.

1/14

**Fig. 1****Fig. 2**

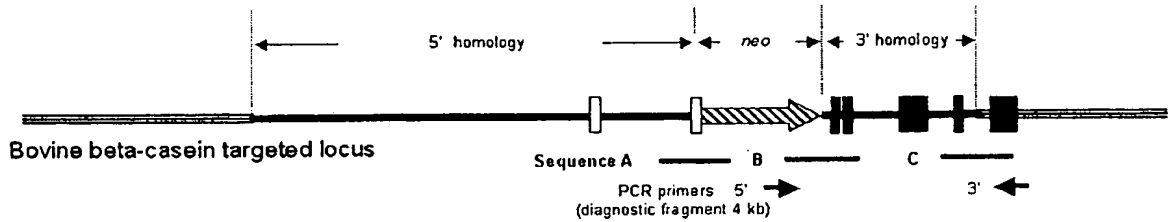
2/14

**Fig. 3****Fig. 4**



3/14

Fig. 5

**Sequence A**

..... cccatccaggaattgagagcc | ccgcggtggcggcgcctctagaactaggatcc | ccaggaagctcctctgtgtcctca .....

5' homology | restriction sites | neo

**Sequence B**

PCR primer 5'

..... cttactccacacagggcatgggtgtctgc | attaataactatgctcaaaaattgtgtacattagcttttaattgtaaaggggttaataaggaatatttgatgatagtgccttgactagagatcataatcagccatacc  
acatttgtagagggtttacttgcttataaaaacctccacacccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaaattc  
acaataaagcatttttcactgcattctagttgtgtgtgtccaaacatcatgtatcttcatgtctggatc | gacaataagaattttttaagctagacc .....

neo | 3' homology

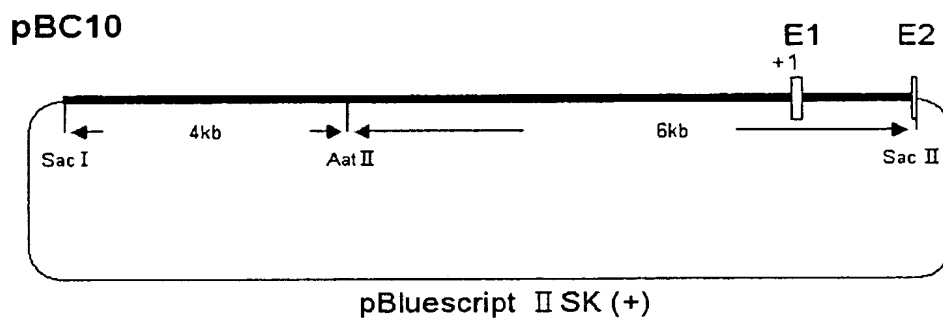
**Sequence C**

3' homology | endogenous locus

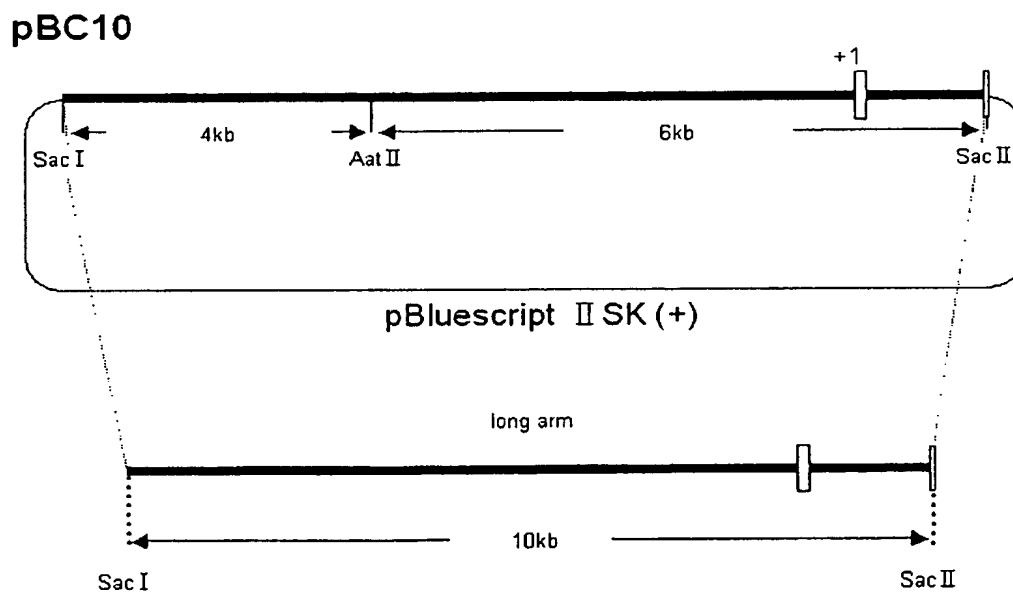
..... ttcatgagtcaaaatacaatctcacagtc | cagatagggacttaaaaggggagagaatagattttgatattttaacaatacacatcctttgtgatcatgattcagcagacatttaataaaatgattccaagtaagc  
cgatgttggtcctagaggaattttataacctttaagagaaggcatagcattgtgttttgaataagattttttatgaaaaagtcacaccaaattgc aaatgggggtgagatgaagagttataacataaactaaat  
ctatgtttgtctctattccacagaattgactgcgactgg | aatat .....

PCR primer 3'

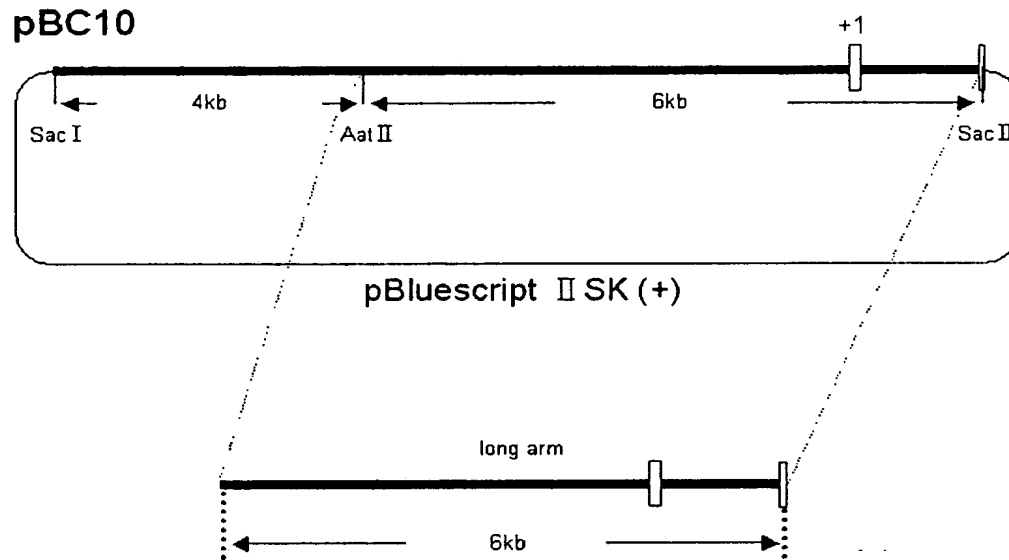
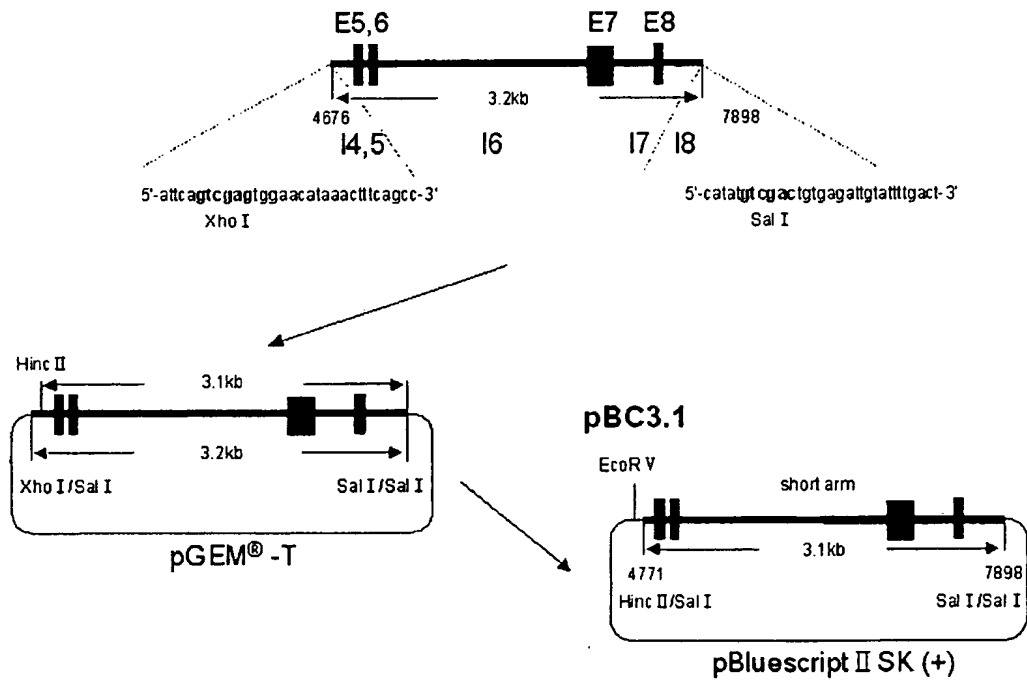
4/14

**Fig. 6**

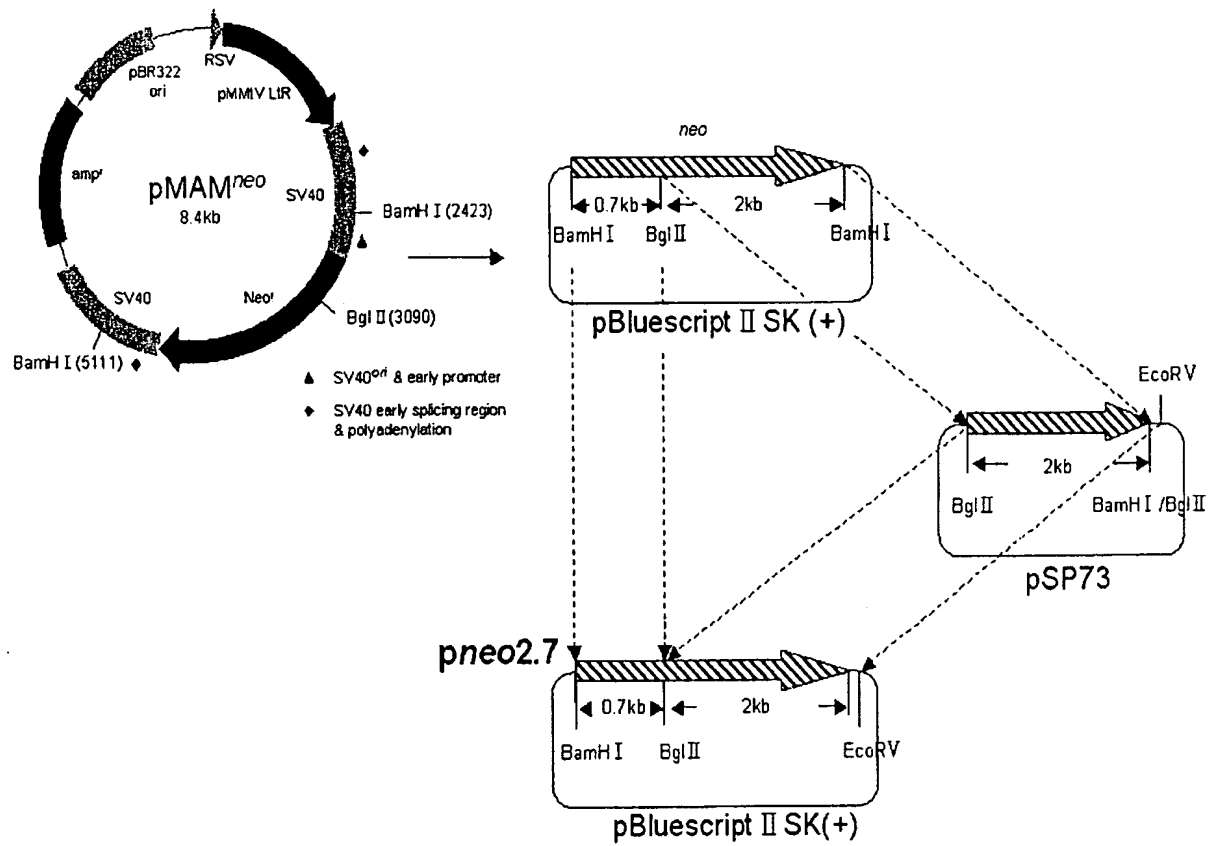
enzymes which do not cut the beta-casein gene locus in BC10 vector  
Sma I , BamH I , Sal I , Spe I , Cla I

**Fig. 7**

5/14

**Fig. 8****Fig. 9**

6/14

**Fig. 10**

7/14

Fig. 11

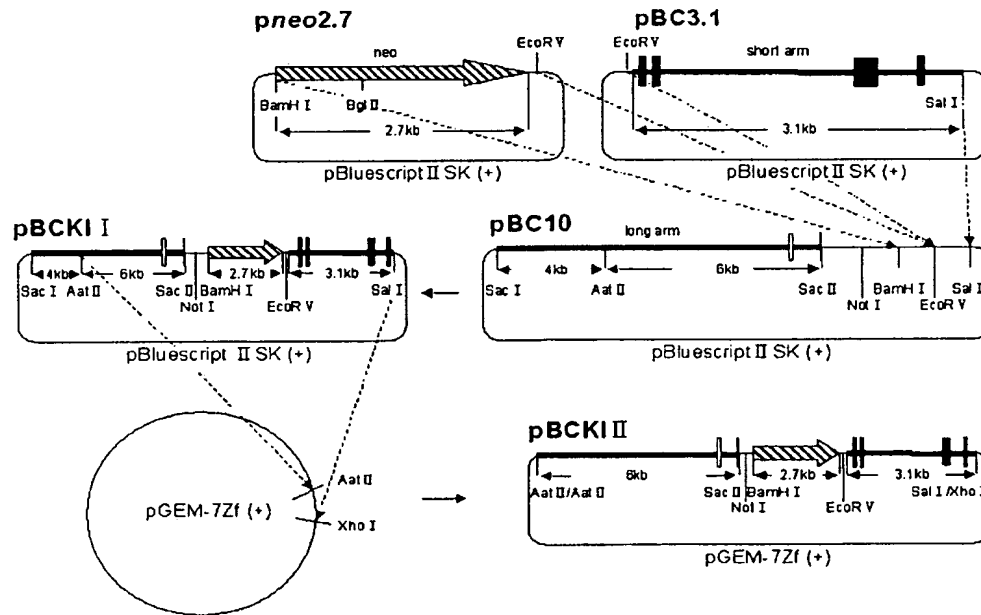
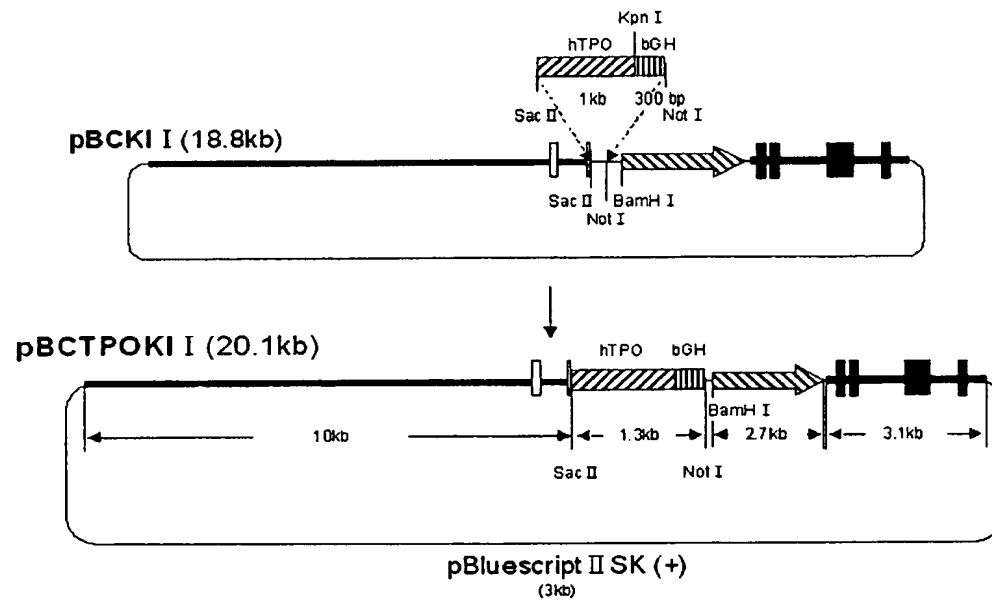


Fig. 12



8/14

Fig. 13

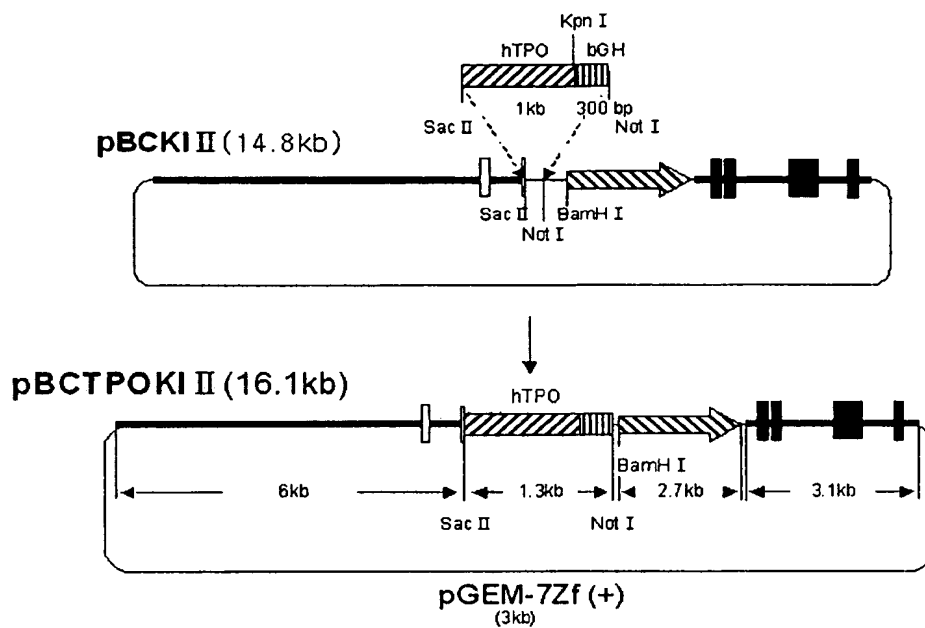
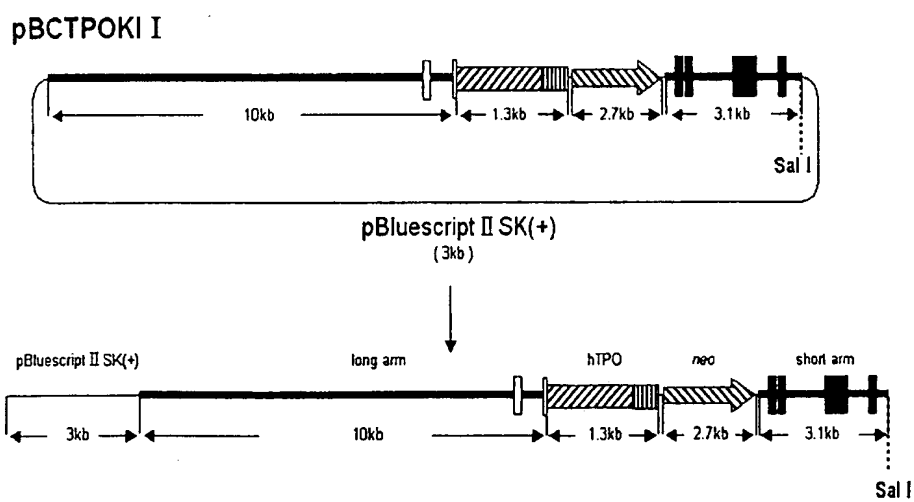
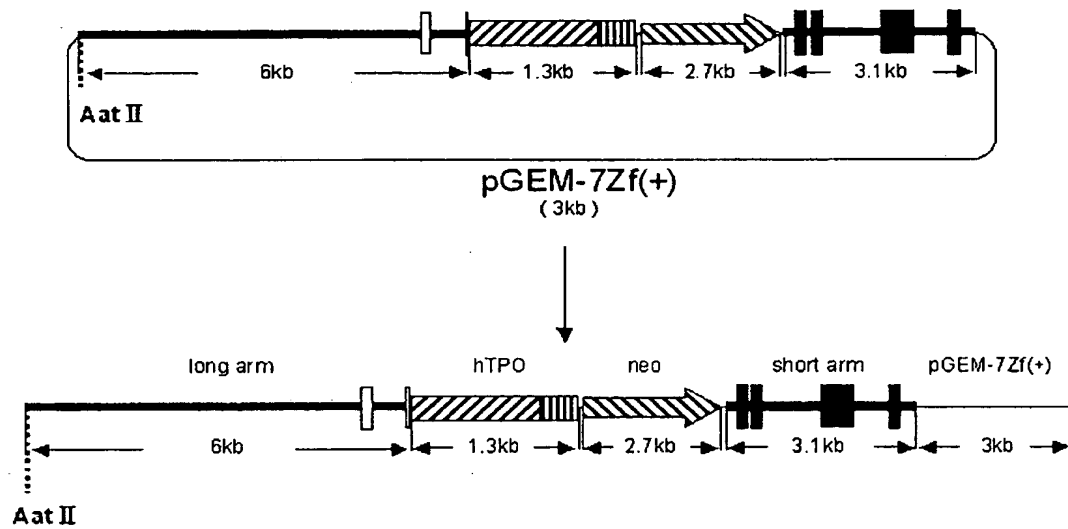


Fig. 14



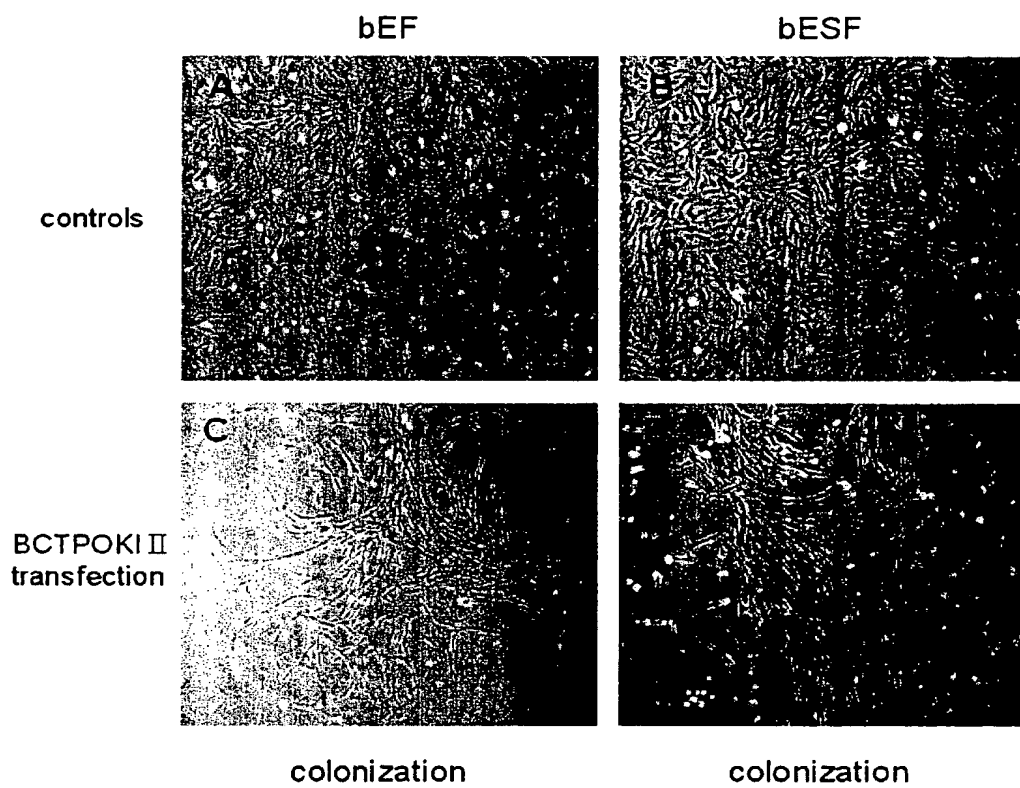
9/14

Fig. 15

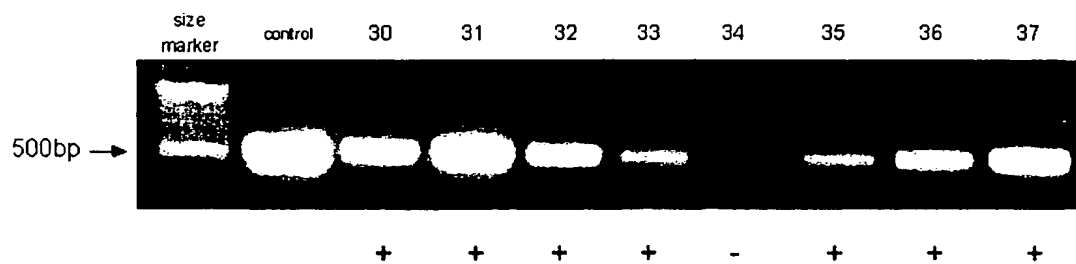
**pBCTPOKI II**

10/14

**Fig. 16**

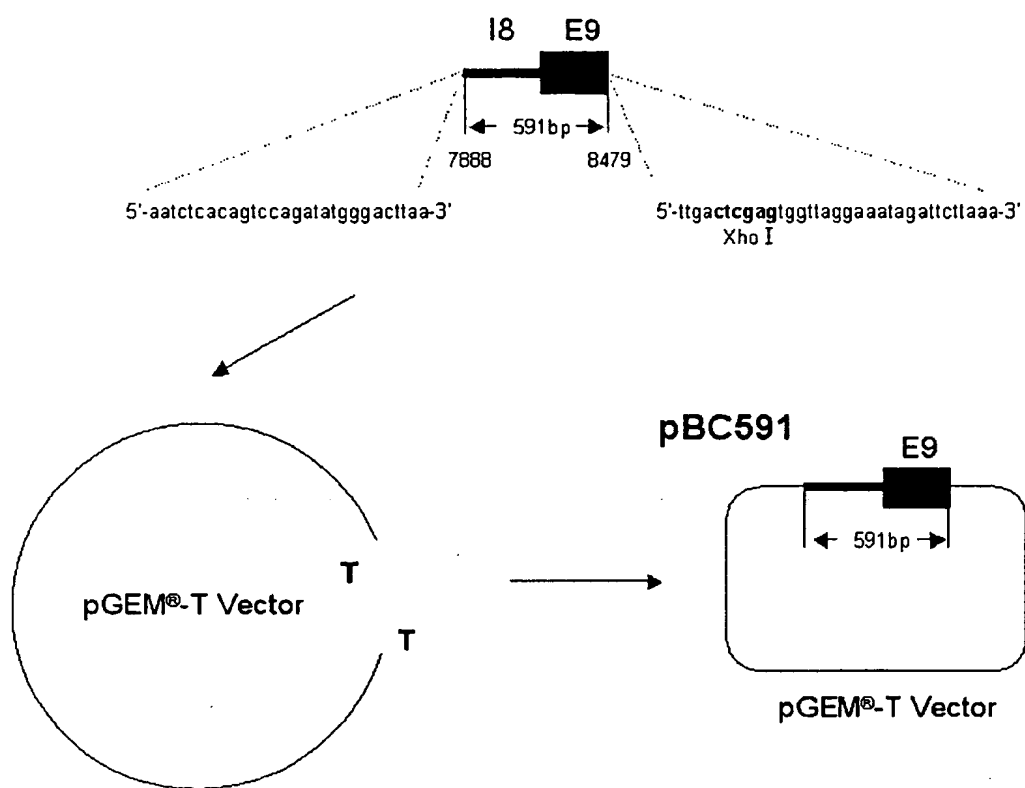


**Fig. 17**

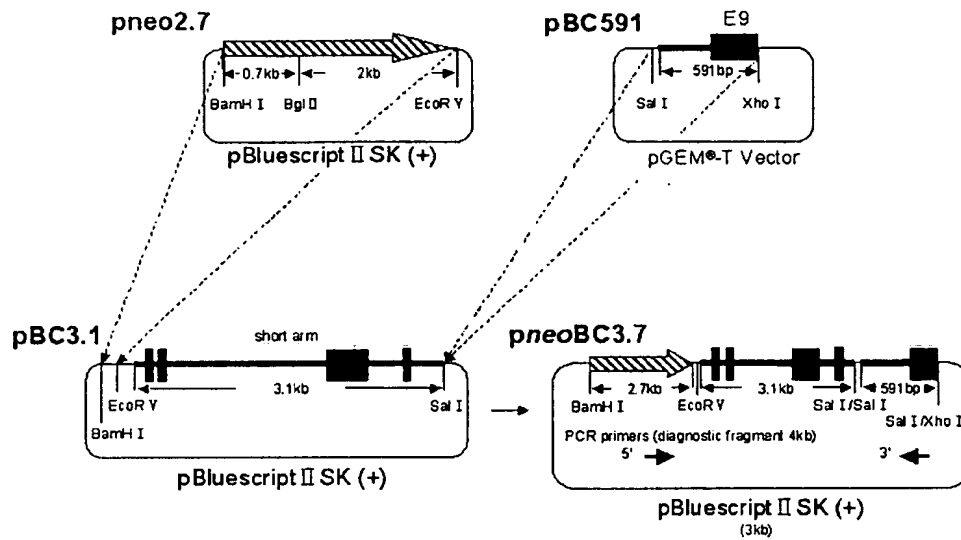
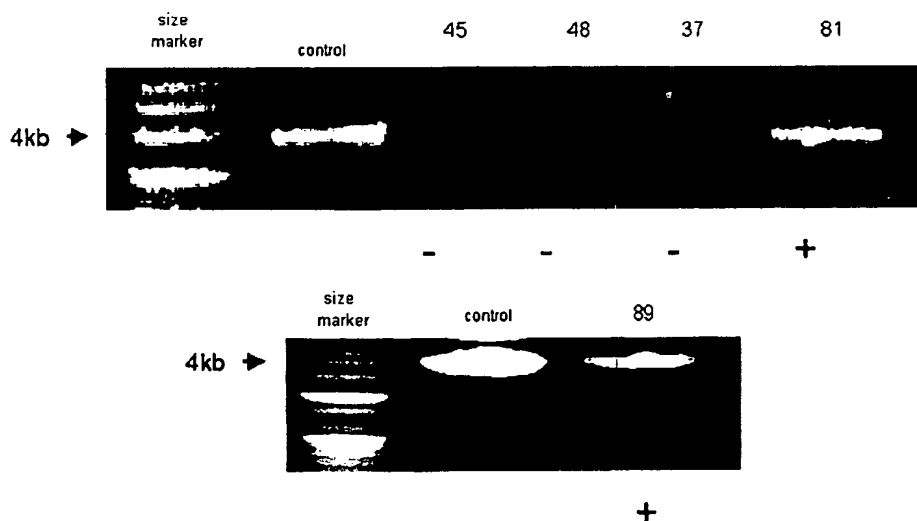




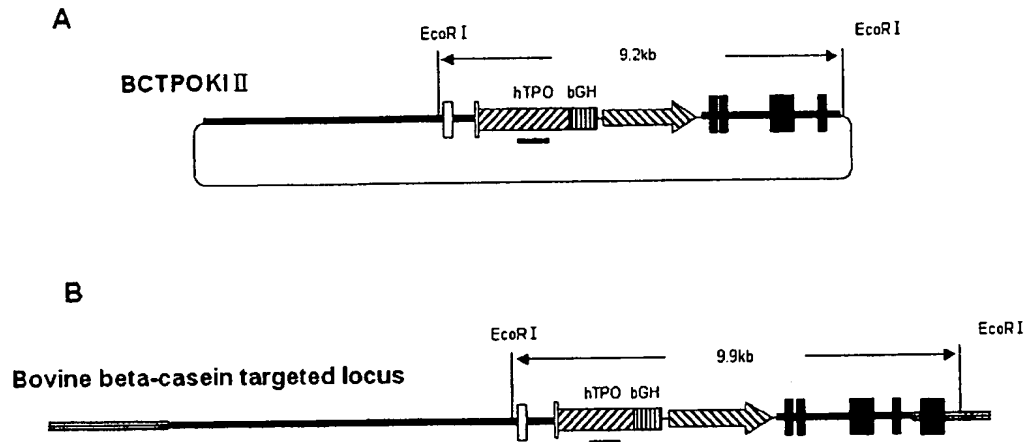
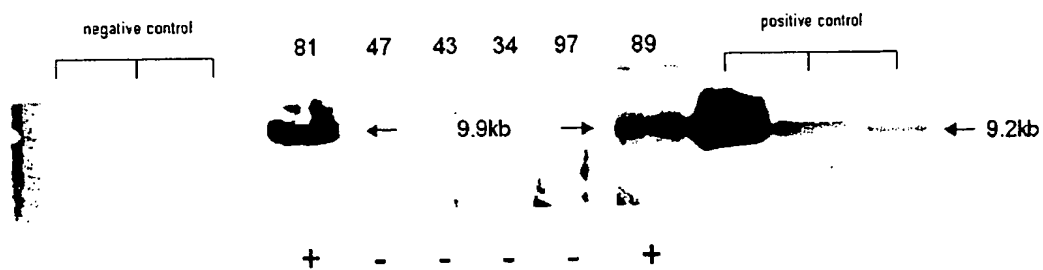
11/14

**Fig. 18**

12/14

**Fig. 19****Fig. 20**

13/14

**Fig. 21****Fig. 22**

14/14

Fig. 23

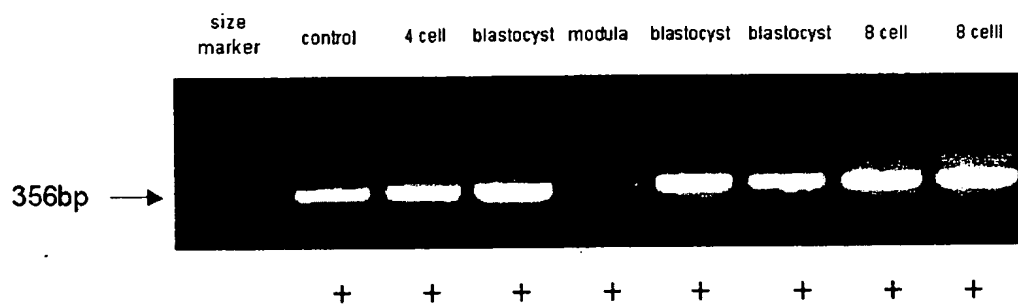


Fig. 24

